

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA



**CARACTERIZACIÓN DE *MYBBP1A* COMO UN NUEVO
GEN SUPRESOR DE TUMORES**

Blanca Felipe Abrio, licenciada en Biotecnología

Tesis doctoral

Director: Dr. Amancio Carnero Moya

Instituto de Biomedicina de Sevilla

2017

CARACTERIZACIÓN DE *MYBBP1A* COMO UN NUEVO GEN SUPRESOR DE TUMORES

Trabajo realizado en el grupo de Biología Molecular del Cáncer, del Departamento de Oncohematología y Genética del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), para optar al grado de doctora en Biología Molecular y Biomedicina.

El trabajo ha sido financiado con una beca de Formación de Personal Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

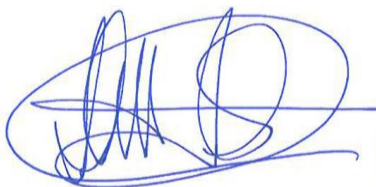
Sevilla, Abril de 2017

La doctoranda,



Blanca Felipe Abrio

El director de la tesis,



Dr. Amancio Carnero Moya

El tutor de la tesis,



Dr. Ricardo Pardal Redondo

RESUMEN

El microambiente tumoral es un entorno heterogéneo y dinámico que se caracteriza por las constantes interacciones entre las células tumorales y las células del estroma y los continuos cambios en la distribución de nutrientes esenciales para el desarrollo del tumor. Frecuentemente se producen deficiencias locales y/o temporales en la vascularización del tumor que provocan la ausencia de glucosa, de oxígeno o de otros nutrientes esenciales para el desarrollo del mismo, generando situaciones con altos niveles de estrés celular. La caracterización de los mecanismos moleculares que favorecen la adaptación de las células tumorales a entornos críticos permitiría identificar nuevas dianas con potencial antitumoral. Por este motivo, realizamos un rastreo genético de pérdida de función en ausencia de glucosa en el que identificamos el gen *MYB binding protein 1A* (*MYBBP1A*). *MYBBP1A* es un regulador de factores de transcripción implicado en la regulación de varios procesos biológicos esenciales.

En este trabajo hemos analizado muestras de tumores humanos, confirmando que la pérdida de *MYBBP1A* es un evento genético que se produce en tumores humanos, especialmente en tumores renales. Hemos analizado la expresión de *MYBBP1A* en una cohorte de 97 pacientes de cáncer renal, en la que hemos observado que la pérdida o reducción de la expresión de *MYBBP1A* se produce en el 8% de los tumores. Esta pérdida estaba asociada a la aparición de metástasis y peor pronóstico en términos de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. En base a esta observación y a que se ha descrito que la degradación de *MYBBP1A* está regulada por pVHL, que se pierde frecuentemente en tumores renales, hemos utilizado líneas celulares de carcinoma renal para estudiar la posible función de *MYBBP1A* como supresor tumoral.

Para estudiar el mecanismo molecular a través del cual *MYBBP1A* participaría en el proceso de tumorigénesis hemos analizado el efecto de la sobreexpresión y del silenciamiento de *MYBBP1A* en líneas celulares de carcinoma renal. La sobreexpresión de *MYBBP1A* suprime el crecimiento celular en todas las líneas celulares utilizadas independientemente del contexto molecular. Por otro lado, el silenciamiento de *MYBBP1A* induce el aumento de algunas propiedades tumorales en las líneas celulares que expresan c-MYB y no expresan pVHL. En estas líneas la reducción de la expresión de *MYBBP1A* induce la activación de c-MYB, conduciendo a la activación de la transcripción de sus genes diana *CD34* y *CXCR4* y al aumento del fenotipo equivalente a célula madre tumoral. Además de inducir el fenotipo de célula madre, hemos encontrado que c-MYB activa la transcripción de *PGC-1 α* . Así mismo, la reducción de *MYBBP1A* activa a *PGC-1 α* directa e indirectamente. De forma directa, la

reducción de MYBBP1A permite la actividad de PGC-1 α y de forma indirecta aumenta los niveles de PGC-1 α a través de la activación de c-MYB. Finalmente, la activación de PGC-1 α conduce al cambio metabólico de glucólisis a OXPHOS, el cual es más eficiente para producir ATP en condiciones de limitación de glucosa. Por tanto, la combinación de estos dos efectos como resultado de la disminución de la expresión de MYBBP1A proporciona una ventaja selectiva a las células tumorales.

Además, hemos analizado la expresión de MYBBP1A y su correlación con la expresión de genes de vías de señalización implicadas en los procesos de iniciación y desarrollo tumoral. Hemos observado que la expresión de MYBBP1A correlaciona negativamente con la expresión de genes involucrados en el fenotipo de célula madre, identificando un subgrupo de carcinomas de células renales de células claras con un patrón de expresión característico. También hemos encontrado un conjunto de genes regulados transcripcionalmente por c-MYB cuya expresión correlaciona negativamente con MYBBP1A y positivamente con PGC-1 α . Además, hemos identificado un subgrupo de tumores, en torno al 8% del total de las muestras, con un patrón de expresión característico: bajos niveles de expresión de MYBBP1A y altos niveles de expresión de PGC-1 α y de los genes diana de c-MYB. Por último, hemos observado que la expresión de MYBBP1A correlaciona negativamente con la expresión de genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. También hemos encontrado que el 9% de las muestras tumorales presentan bajos niveles de expresión de MYBBP1A y altos niveles de expresión de los genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Por tanto, estos análisis bioinformáticos confirman nuestros datos experimentales.

SUMMARY

Tumor microenvironment is heterogeneous and dynamic due to constant tumor and stromal cells interactions and continuous changes in nutrient distribution that are essential for tumor development. Frequently, there is a local and/or temporal lack of efficient vasculature that leads to glucose, oxygen or other nutrients depletion, increasing the stress levels of tumor cells. Characterization of molecular mechanisms that enable tumor cells to adapt to host microenvironments would allow identifying new targets for cancer therapy. To this end, we have performed a genetic loss of function screen in absence of glucose, identifying *MYB binding protein 1A* (*MYBBP1A*). *MYBBP1A* is a regulator of transcription factors involved in the control of several relevant biological processes.

In this work we have analyzed the expression of *MYBBP1A* in human tumors, confirming that *MYBBP1A* loss is a genetic event found in renal tumors. In a cohort of 97 patients of renal cancer the *MYBBP1A* expression is lost or reduced in 8% of tumors. This loss was associated with metastasis and poor prognosis, measured by disease free survival and overall survival. Based on this observation and published data that *MYBBP1A* is a target of pVHL, which is frequently lost in renal tumors, we have used renal carcinoma cell lines to study the possible role of *MYBBP1A* as a tumor suppressor.

In order to study the molecular mechanism through *MYBBP1A* would take part in tumorigenesis, we analyzed the effect of *MYBBP1A* overexpression and downregulation in renal carcinoma cell lines. *MYBBP1A* overexpression suppresses cell growth in all cell lines used regardless of the molecular context. On the other hand, downregulation of *MYBBP1A* increases some tumor properties in cell lines that express c-MYB and do not express pVHL. In these cell lines downregulation of *MYBBP1A* induces c-MYB activation, inducing transcriptional activation of its target genes *CD34* and *CXCR4*, which lead to an increase in cancer stem cell-like phenotype. In addition, we have shown that c-MYB induce the transcription of *PGC-1 α* . Hence, *MYBBP1A* downregulation activates *PGC-1 α* direct and indirectly. In a direct manner, reduction of the *MYBBP1A* expression des-represses *PGC-1 α* activity and indirectly increases *PGC-1 α* mRNA levels through c-MYB activation. Finally, *PGC-1 α* activation leads to a metabolic shift from glycolysis to OXPHOS, which is more efficient to produce ATP under glucose limitations. Therefore, combined effects of *MYBBP1A* downregulation provide selective advantage over other tumor cells.

Furthermore, we analyzed *MYBBP1A* expression and its correlation to the expression of genes of signaling pathways involved in tumor initiation and

development. We observed that *MYBBP1A* correlated negatively with the expression of genes involved in stem cell phenotype, detecting a subgroup of clear cell renal cell carcinomas with a characteristic expression pattern. We have also found some genes regulated transcriptionally by c-MYB whose expression correlated negatively with *MYBBP1A* and positively with *PGC-1 α* expression. In addition, we identified a subgroup of tumors, 8% of all tumor samples, with a characteristic expression pattern: low expression of *MYBBP1A* and high expression of *PGC-1 α* and c-MYB target genes. Finally, we observed that *MYBBP1A* expression correlated negatively with the expression of tricarboxylic acid cycle genes. We also detected that 9% of tumor samples showed low expression of *MYBBP1A* and high expression of tricarboxylic acid cycle genes. This bioinformatic analysis supports our experimental conclusions.

ÍNDICE

RESUMEN.....	v
SUMMARY	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xvi
ABREVIATURAS	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Microambiente tumoral.....	3
2. Metabolismo de las células tumorales.....	4
2.1. El efecto Warburg	5
2.2. Mecanismos moleculares implicados en la reprogramación metabólica	6
2.3. Tumores oxidativos	8
3. Papel de PGC-1 α en la regulación del metabolismo celular	10
4. Rastreo genético por pérdida de función en ausencia de glucosa	12
5. Proteína 1A de unión a MYB.....	13
5.1. MYBBP1A como regulador de factores de transcripción	14
5.2. Papel de MYBBP1A en el desarrollo embrionario	15
5.3. Papel de MYBBP1A en mitosis	16
5.4. Papel de MYBBP1A en senescencia.....	17
5.5. Papel de MYBBP1A en la regulación del estado energético intracelular ...	17
5.6. Papel de MYBBP1A en la síntesis de ribosomas	18
5.7. Regulación de MYBBP1A	19
5.8. MYBBP1A y cáncer.....	20
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. Reactivos biológicos usados	29
2. Técnicas básicas de biología molecular	29
2.1. Transformación de células quimiocompetentes.....	29
2.2. Extracción de ADN plasmídico	30
3. Cultivos celulares	31
3.1. Líneas celulares	31
3.2. Cultivo y conservación de las líneas celulares	31

3.3. Transfección de células	32
3.3.1. Transfección por precipitación con fosfato cálcico	32
3.3.2. Transfección mediante el kit comercial Effectene (Quiagen)	32
3.3.3. Transfección mediante el kit comercial TransIt-X2 (Mirus).....	33
3.4. Infección retroviral.....	33
3.5. Selección de células transfectadas o infectadas	33
4. Ensayos celulares	34
4.1. Ensayos de metabolismo	34
4.1.1. Ensayo de proliferación en condiciones limitantes de nutrientes	34
4.1.2. Cuantificación de ATP total	34
4.1.3. Cuantificación de la relación ATP/ADP	34
4.1.4. Ensayo de sensibilidad a Rotenona	35
4.1.5. Recogida de células en condiciones limitantes de nutrientes	35
4.1.6. Cuantificación de ROS mitocondrial.....	35
4.2. Ensayos de tumorigénesis	36
4.2.1. Ensayo de proliferación.....	36
4.2.2. Clonabilidad	36
4.2.3. Crecimiento en agar blando	36
4.2.4. Ensayo de migración.....	37
4.2.5. Análisis y clasificación de clones.....	37
4.2.6. Ensayo de formación de tumoresferas.....	37
4.2.7. Ensayo de formación de tumoresferas a partir de una célula aislada .	37
4.2.8. Análisis de marcadores por citometría de flujo	38
5. Ensayos <i>in vivo</i>	38
5.1. Generación de <i>xenografts</i>	38
5.2. Necropsias	39
6. Técnicas de análisis de expresión a nivel de ARN	39
6.1. Extracción de ARN total	39
6.2. Transcripción reversa.....	40
6.3. PCR cuantitativa a tiempo real	40
6.4. PCR array	42
6.4.1. Eliminación de ADN genómico y transcripción reversa	42

6.4.2.	PCR cuantitativa a tiempo real	42
6.4.3.	Análisis de los resultados	43
6.5.	Hibridación de matrices de ARN	43
7.	Técnicas de análisis de expresión a nivel de proteínas	44
7.1.	Anticuerpos	44
7.2.	Extracción de proteína total	45
7.3.	Western blot	45
7.4.	Cuantificación de bandas de western blot	46
7.5.	Inmunoprecipitación	46
7.6.	Inmunofluorescencia	46
8.	Análisis de muestras de pacientes	47
8.1.	Cohorte de pacientes	47
8.2.	Inmunohistoquímica	47
8.3.	Análisis estadístico	48
9.	Análisis de bases de datos públicas	48
9.1.	Bases de datos	48
9.2.	Análisis en R2	49
10.	Análisis estadístico	50
RESULTADOS		53
1.	Pérdida de MYBBP1A en tumores humanos	55
2.	<i>MYBBP1A</i> como gen supresor de tumores en células de carcinoma renal	63
2.1.	Caracterización de líneas celulares de carcinoma renal	63
2.2.	Ausencia de translocación de MYBBP1A al nucleoplasma en condiciones limitantes de glucosa	65
2.3.	Efecto de la sobreexpresión de <i>MYBBP1A</i>	67
2.4.	Efecto de la reducción de la expresión de MYBBP1A y su relación con metástasis	68
2.5.	Efecto de la reducción de la expresión de MYBBP1A en el fenotipo de célula madre	77
3.	La reducción de MYBBP1A induce la activación de c-MYB	82
4.	Activación de PGC-1 α por reducción de los niveles de MYBBP1A	86
5.	Plasticidad metabólica de células con niveles reducidos de MYBBP1A	92

6. Análisis de expresión de MYBBP1A en bases de datos públicas de tumores renales	100
6.1. Correlación de la expresión de <i>MYBBP1A</i> con genes de rutas de señalización reguladoras del fenotipo de célula madre	102
6.2. Efecto de la pérdida de <i>MYBBP1A</i> en la activación de <i>c-MYB</i> y su papel en la progresión tumoral	103
DISCUSIÓN.....	109
CONCLUSIONES	121
CONCLUSIONS	125
BIBLIOGRAFÍA.....	129

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías de señalización implicadas en la regulación del metabolismo de las células tumorales.....	9
Figura 2. Vía de señalización de PGC-1 α	11
Figura 3. Rastreo genético realizado para encontrar nuevos genes supresores de tumores implicados en la superación de condiciones restrictivas.....	12
Figura 4. Estructura y modelo de translocación de MYBBP1A.....	13
Figura 5. Mutaciones en el gen <i>MYBBP1A</i> descritas en tumores humanos.....	55
Figura 6. Análisis de los niveles de expresión y metilación de <i>MYBBP1A</i> en tumores humanos.....	57
Figura 7. Disminución de la expresión de <i>MYBBP1A</i> en tumores de riñón, hígado y páncreas.....	58
Figura 8. Pérdida de MYBBP1A en carcinomas de células renales.....	60
Figura 9. La pérdida de MYBBP1A favorece el fenotipo metastásico.....	61
Figura 10. La pérdida de MYBBP1A reduce la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global.....	62
Figura 11. Análisis de la supervivencia global de pacientes con carcinomas renales de células claras de la base de datos pública TCGA.....	63
Figura 12. Caracterización molecular de las líneas clulares de carcinoma de células renales.....	64
Figura 13. Niveles de expresión de los genes <i>MYBBP1A</i> , <i>c-MYB</i> , <i>AURKB</i> y <i>VHL</i> en líneas de carcinoma de células renales.....	65
Figura 14. La disminución de la concentración de glucosa no induce la translocación de MYBBP1A del nucléolo al nucleoplasma.....	66
Figura 15. La limitación de glucosa no induce la acumulación de p53 en líneas de carcinoma renal.....	67
Figura 16. La sobreexpresión de <i>MYBBP1A</i> suprime el crecimiento de las líneas celulares de carcinoma de células renales.....	68
Figura 17. Validación del shARN contra <i>MYBBP1A</i>	69
Figura 18. Efecto de la reducción de los niveles de MYBBP1A en la proliferación de las líneas celulares de carcinoma de células renales.....	70
Figura 19. Efecto de la reducción de los niveles de MYBBP1A mediante un segundo shARN contra <i>MYBBP1A</i> en la proliferación de las líneas 786-O y ACHN.....	71
Figura 20. Efecto de la reducción de MYBBP1A en la capacidad de formación de colonias de las células.....	72
Figura 21. Efecto de la reducción de MYBBP1A en el crecimiento independiente de anclaje en líneas celulares de carcinoma de células renales.....	73

Figura 22. Efecto de la reducción de los niveles de MYBBP1A en la capacidad de migración de líneas celulares de carcinoma de células renales.	74
Figura 23. Las líneas A498 y 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A forman tumores de mayor tamaño que las células control cuando se inyectan en ratones inmunodeprimidos.	76
Figura 24. Las líneas A498 y 786-O con niveles bajos de MYBBP1A favorecen la aparición de metástasis cuando se inyectan en ratones inmunodeprimidos.	76
Figura 25. Efecto de la reducción de MYBBP1A en el fenotipo de los clones.	78
Figura 26. Efecto de la reducción de los niveles de MYBBP1A en la formación de tumoresferas en líneas de carcinoma de células renales.	78
Figura 27. Ensayo de formación de esferas a partir de una célula aislada.	79
Figura 28. Efecto de la reducción de MYBBP1A en la expresión de genes relacionados con el fenotipo de célula madre.	80
Figura 29. Efecto de la reducción de MYBBP1A en la expresión de genes involucrados en la transición epitelio-mesénquima.	81
Figura 30. Efecto del segundo shARN frente a <i>MYBBP1A</i> en el fenotipo de célula madre en las líneas 786-O y ACHN.	82
Figura 31. Co-localización nucleolar de MYBBP1A y c-MYB en líneas de carcinoma de células renales con altos niveles de c-MYB.	83
Figura 32. Efecto de la disminución de los niveles de MYBBP1A en la inducción de la transcripción de genes diana de c-MYB.	84
Figura 33. Efecto de la disminución de los niveles de MYBBP1A en el porcentaje de células CD34 ⁺ de las líneas celulares de carcinoma de células renales.	85
Figura 34. Papel de pVHL en el fenotipo asociado a la reducción de MYBBP1A.	86
Figura 35. La reducción de los niveles de MYBBP1A induce la activación de PGC1 α	87
Figura 36. c-MYB regula la transcripción de PGC-1 α	89
Figura 37. Efecto de la reducción de MYBBP1A en la expresión de los genes que codifican para las enzimas de la glucólisis.	90
Figura 38. La reducción de los niveles de PGC-1 α no afecta a la expresión de <i>c-MYB</i>	91
Figura 39. PCR array de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa en las líneas 786-O control y 786-O con bajo MYBBP1A a glucosa alta y baja.	93
Figura 40. La reducción de MYBBP1A induce la reprogramación metabólica a OXPHOS en la línea 786-O.	94
Figura 41. Efecto de la reducción de MYBBP1A en la sensibilidad a rotenona en la línea 786-O.	95
Figura 42. Efecto de la reducción de MYBBP1A en la producción de ROS mitocondrial.	96

Figura 43. Efecto de la reducción de MYBBP1A en la producción de ATP celular..	97
Figura 44. Efecto de la reducción de MYBBP1A en la regulación de rutas metabólicas y de la autofagia.	99
Figura 45. Niveles de expresión de MYBBP1A en tumores renales humanos.	101
Figura 46. La expresión de <i>MYBBP1A</i> correlaciona negativamente con la expresión de <i>PGC-1α</i> , <i>SMARCA1</i> , <i>REST</i> , <i>SMAD4</i> , <i>SMAD2</i> y <i>PCGF5</i> en muestras de pacientes de cáncer de riñón.	103
Figura 47. Los niveles de expresión bajos de <i>MYBBP1A</i> se asocian con altos niveles de expresión de genes diana de c-MYB pertenecientes a rutas metabólicas.....	105
Figura 48. Estudio de la correlación de la expresión de <i>MYBBP1A</i> con la expresión de los genes de la glucólisis y gluconeogénesis.	106
Figura 49. La expresión de <i>MYBBP1A</i> correlaciona negativamente con la expresión de genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.....	107
Figura 50. Modelo del papel de MYBBP1A como supresor de tumores y su posible mecanismo de acción.	119

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plásmidos utilizados en esta tesis.....	29
Tabla 2. Líneas celulares utilizadas en esta tesis	31
Tabla 3. Sondas TaqMan.....	41
Tabla 4. Sondas utilizadas en las matrices de ARN.....	43
Tabla 5. Anticuerpos utilizados en esta tesis	44
Tabla 6. Ejemplos de mutaciones en el gen <i>MYBBP1A</i> descritas en tumores humanos	55
Tabla 7. Resumen de las características de la población de estudio.	59
Tabla 8. Cuantificación de las colonias formadas en el ensayo de clonabilidad tras la sobreexpresión de <i>MYBBP1A</i>	68
Tabla 9. Porcentaje de células CD34 ⁺ de cada línea celular.....	85

ABREVIATURAS

α -KG: alfa-cetoglutarato

aa: aminoácido

ACSS1: acetil-CoA sintetasa 2, mitocondrial

ADH5: alcohol deshidrogenasa clase 3

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN codificante

ADNr: ADN ribosómico

ADP: adenosín-difosfato

AMP: adenosín-monofosfato

AMPK: proteína quinasa activada por AMP

ARN: ácido ribonucleico

ARNasa: ribonucleasa A

ARNm: ARN mensajero

ARNr: ARN ribosómico

ATP: adenosín-trifosfato

BPGM: bisfosfoglicerato mutasa

CCR: carcinoma de células renales

CCRcc: carcinoma de células renales de células claras

CCRcr: carcinoma de células renales de células cromóforas

CCRp: carcinoma de células renales de células papilares

CKs: citoquinas

CoA: coenzima A

CSC: células madres tumorales

C-terminal: extremo carboxi terminal de la proteína

CXCR4: receptor de quimioquina tipo 4

DLAT: dihidrolipoil-lisina-residuo acetiltransferasa, componente del complejo piruvato deshidrogenasa

DLD: dihidrolipoil deshidrogenasa

DMEM: medio de cultivo Eagle modificado por Dulbeco

DMSO: dimetilsulfóxido

EDTA: ácido etilen diamino tetracético

eNoSC: complejo silenciador nucleolar dependiente de energía

FACS: citometría de flujo

FBS: suero fetal bovino

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato

GLUT: transportador de glucosa

G418: genética

G6PC: glucosa-6-fosfatasa

HIF: factor inducible por hipoxia

HK2: hexoquinasa 2

IF: inmunofluorescencia

IL: interleuquina

IP: inmunoprecipitación

LDHA: lactato deshidrogenasa A

LB: medio de cultivo de bacterias Luria-Bertani

LKB1: quinasa del hígado B1

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos

MIFT: factor de transcripción asociado con microftalmia

MYBBP1A: por sus siglas en inglés Myb Binding Protein 1A

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

N-terminal: extremo amino terminal de la proteína

NRD: dominio de regulación negativa

NRF: factor nuclear de respiración

ORF: marco de lectura

OXPHOS: fosforilación oxidativa

Pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato alcalino

PCGF5: proteína 5 con dominio de dedos de RING del grupo de proteínas Polycomb

PCK1: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDH: piruvato deshidrogenasa

PDHA1: subunidad alfa del componente E1 del complejo PDH

PDHB: subunidad beta del componente E1 del complejo PDH

PDK: piruvato deshidrogenasa quinasa

PFKM: fosfofructoquinasa, músculo

PGAM1: fosfoglicerato mutasa 1

PGC-1 α : co-activador del receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas

PGK1: fosfoglicerato quinasa 1

PHD: prolil-hidroxilasa

PKM: piruvato quinasa, músculo

pVHL: proteína von Hippel Lindau

qPCR: PCR cuantitativa

REST: factor de transcripción de silenciamiento de RE1

RO: oncocitoma renal

RPMI: medio Roswell Park Memorial Institute

RT-PCR: transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa

RT-qPCR: transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

SD: desviación estándar

SDS: docedil sulfato sódico

SG: supervivencia global

shARN: horquilla corta de ARN, complementaria a ARNm

SLE: supervivencia libre de enfermedad

SMAD2: por sus siglas en inglés *Mothers Against Decantaplegic homolog 2*

SMAD4: por sus siglas en inglés *Mothers Against Decantaplegic homolog 4*

SMARCAD1: por sus siglas en inglés *SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1*

TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos

TCGA: por sus siglas en inglés *The Cancer Genome Atlas*

TMA: por sus siglas en inglés *Tissue Microarrays*

VHL: von Hippel Lindau

WB: western blot

INTRODUCCIÓN

1. Microambiente tumoral

El cáncer es una enfermedad genética o epigenética compleja que engloba un conjunto de enfermedades con una característica común, el crecimiento descontrolado de determinadas células del organismo. El proceso de iniciación tumoral o tumorigénesis consta de varias etapas en las que se producen una serie de cambios genéticos o epigenéticos que conducen progresivamente a la transformación de células normales en células cancerígenas ¹.

Los tumores no son un conjunto de células cancerígenas relativamente homogéneas, sino estructuras complejas compuestas por distintos tipos de células especializadas que se comunican entre ellas, generando una red de señalización y un entorno específico, conocido como microambiente tumoral². En la mayoría de tumores se pueden distinguir los siguientes tipos celulares:

- Células cancerígenas: células que han sufrido mutaciones de ganancia o pérdida de función en oncogenes y genes supresores de tumores respectivamente. En general constituyen la mayor parte de la masa tumoral y son las responsables de la progresión del tumor. Entre ellas encontramos las células madres tumorales (CSC): células con capacidad de auto-renovación y diferenciación. Presentan las mismas características que las células madres normales, con la diferencia de que los mecanismos que controlan estos procesos están desregulados, originando una continua expansión y producción de células diferenciadas. Constituyen una pequeña población celular del tumor y se cree que son el origen de todas las células que forman el tumor, de la resistencia a agentes quimioterápicos y las causantes de los procesos de recaída y metástasis.
- Estroma: células no tumorales que favorecen o impiden la progresión y diseminación del tumor.
 - Fibroblastos asociados a cáncer: son las células más influyentes del estroma, secretan una amplia variedad de factores solubles que promueven la iniciación tumoral, progresión y metástasis. Sin embargo, en algunos casos pueden secretar moléculas que provoquen el efecto contrario, la supresión del desarrollo tumoral³.
 - Células endoteliales: células que dan lugar a los vasos sanguíneos que suministran oxígeno y nutrientes a las distintas zonas del tumor.
 - Pericitos: células mesenquimales que rodean a las células endoteliales, proporcionándoles señalización paracrina y estabilidad.

- Células del sistema inmune: células infiltradas en el tumor que pueden tener actividad pro-tumoral o antitumoral⁴. La mayoría de las células del sistema inmune que favorecen la progresión del tumor son células del sistema innato, las cuales suministran factores de crecimiento, factores pro-angiogénicos y enzimas que modifican la matriz extracelular, potenciando las propiedades tumorigénicas de las células tumorales.

Las interacciones entre las células tumorales y las células del estroma, junto con la distinta distribución espacial y temporal de nutrientes esenciales para el desarrollo del tumor, provocan que el microambiente tumoral sea heterogéneo, dinámico y presente altos niveles de estrés. De este modo, el microambiente en el que se encuentren las células tumorales puede modificar las propiedades tumorigénicas iniciales de las mismas. Las condiciones específicas del microambiente promueven la selección de la célula tumoral que mejor se adapte al entorno, convirtiéndose en el mayor contribuyente a la proliferación y mantenimiento del tumor. En cambio, esa misma célula en un entorno más restrictivo no contribuiría al crecimiento tumoral. Una de las causas de los continuos cambios del microambiente tumoral es el déficit de vascularización durante el inicio y el crecimiento del tumor, que se traduce en falta de oxígeno y nutrientes, dificultando el desarrollo tumoral⁵. En estos casos, la falta de oxígeno o hipoxia es un factor clave en la fisiología del tumor que promueve la iniciación, progresión tumoral y la resistencia a terapias. Concretamente, la hipoxia está relacionada con cambios en el metabolismo de las células para conseguir una fuente de nutrientes alternativa, que normalmente implica un alto consumo de glucosa. Sin embargo, hasta que se produce la neovascularización el tumor está sometido a bajas concentraciones de glucosa, de forma que las células tienen que adaptar su metabolismo en función de las condiciones restrictivas del medio para sobrevivir. De este modo, habrá células con ciertas mutaciones que les proporcionen una ventaja para adaptarse y proliferar en entornos críticos, favoreciéndose el crecimiento de distintos subclones del tumor en función de las condiciones del medio. Esto aumenta la heterogeneidad entre las células de un mismo tumor y entre las distintas mutaciones que se observan en tumores de un mismo tipo.

2. Metabolismo de las células tumorales

La reprogramación metabólica de las células tumorales ha sido identificada en los últimos años como una de las características distintivas del cáncer². El metabolismo de las células tumorales se ve afectado por las propias mutaciones del tumor y por las

condiciones del microambiente que lo rodea. La activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores provocan la activación de rutas de señalización que controlan el crecimiento celular y la supervivencia. Para poder mantener la elevada tasa de proliferación alcanzada por la modificación de estas vías de señalización, las células necesitan modificar su metabolismo. Además, las condiciones restrictivas del microambiente tumoral, como la hipoxia, la limitación de nutrientes y pH ácido, también contribuyen a la adaptación del metabolismo celular. La finalidad de esta reprogramación es mantener las tres necesidades básicas de las células tumorales: rápida obtención de energía en forma de ATP, altas tasas de biosíntesis de macromoléculas y mantenimiento del balance de estrés oxidativo⁶.

El efecto Warburg es la adaptación metabólica más conocida de las células tumorales pero no es la única. Los constantes cambios que se producen en el microambiente complican la regulación del metabolismo tumoral, siendo la fosforilación oxidativa (OXPHOS) también un factor clave en dicha regulación. Además, se ha propuesto que la fosforilación oxidativa y la glucólisis aeróbica cooperan durante el proceso de tumorigénesis, activándose una forma de obtención de energía u otra según las necesidades energéticas de las distintas etapas que forman parte de este proceso⁷.

2.1. El efecto Warburg

El fenotipo metabólico más estudiado de las células tumorales es el llamado efecto Warburg, el cual consiste en la obtención de energía en forma de ATP mediante la glucólisis en vez de la fosforilación oxidativa, incluso a concentraciones normales de oxígeno⁸. Una vez producido el piruvato a través de la vía glucolítica, en lugar de ser metabolizado en la mitocondria mediante el ciclo de Krebs, es transformado en lactato por la enzima lactato deshidrogenasa A (LDHA), en un proceso conocido como glucólisis aeróbica. Este cambio facilita una forma rápida de obtener ATP, pero es menos eficaz que la fosforilación oxidativa, obteniéndose menos cantidad de ATP por molécula de glucosa consumida. Para compensar esta menor eficiencia, las células tumorales consumen grandes cantidades de glucosa.

La rápida obtención de energía no es la única ventaja que adquieren las células cambiando su metabolismo a la glucólisis aeróbica, también les permite sobrevivir en condiciones irregulares de oxígeno. En el tumor hay muchas zonas hipóxicas, a las que no llega oxígeno hasta que no se generan nuevos vasos sanguíneos. En estas condiciones las células que basan su metabolismo en la fosforilación oxidativa exclusivamente no sobreviven⁹. Además, el lactato, producto final de la glucólisis

aeróbica, acidifica el microambiente tumoral favoreciendo el proceso de invasión y suprimiendo el efecto anticancerígeno del sistema inmune¹⁰. El lactato extracelular expulsado por las células tumorales también puede ser metabolizado por las células del estroma. Los transportadores de monocarboxilato MCT1 y MCT2 facilitan la entrada del lactato en dichas células, siendo posteriormente transformado en piruvato, el cual puede ser expulsado al medio extracelular y ser capturado por las células tumorales o puede ser metabolizado por la ruta de OXPHOS en las propias células del estroma¹¹. Así se establece una relación simbiótica entre las células tumorales y las células del estroma que favorece el crecimiento tumoral.

Sin embargo, la mayor ventaja que aporta la glucólisis aeróbica es la fuente de precursores para reacciones anabólicas. Los intermediarios de la glucólisis se acumulan y son desviados a rutas de síntesis de aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos. Esta acumulación se produce por la sobreexpresión de la isoforma embrionaria de la enzima piruvato kinasa (PK), la cual cataliza la conversión del fosfoenolpiruvato en piruvato. La isoforma embrionaria, PKM2, favorece la conformación dimérica en vez de tetramérica de esta enzima. La conformación dimérica es menos activa, provocando la acumulación de intermediarios de la ruta glucolítica¹². Uno de estos intermediarios es la glucosa-6-fosfato, la cual es redirigida a la ruta de las pentosas fosfato donde va a generar ribosa, esencial para la síntesis de nucleótidos, y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), potente agente reductor implicado en el control de los niveles de estrés oxidativo.

2.2. Mecanismos moleculares implicados en la reprogramación metabólica

La mayoría de las vías de señalización activas en procesos tumorigénicos, por activación de oncogenes o pérdida de genes supresores de tumores, convergen en la reprogramación del metabolismo celular. De este modo, varias de las vías más conocidas, como las reguladas por HIF1 α , AMPK, p53, MYC y PI3K están implicadas en la obtención del fenotipo glucolítico (Figura 1A).

Los factores de transcripción inducibles por hipoxia 1 y 2 (HIF1 y HIF2) regulan la expresión génica en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno. Son heterodímeros compuestos por una subunidad que se expresa de forma constitutiva, HIF1 β o ARNT, y una subunidad que se estabiliza en condiciones de hipoxia, HIF1 α o HIF2 α ¹³. En condiciones normales de oxígeno, la subunidad HIF α es hidroxilada por las enzimas prolil-hidroxilasas (PHDs), lo que conlleva su reconocimiento por parte de la E3 ubiquitina ligasa von-Hippel Lindau (pVHL) y su posterior degradación vía

proteasoma. Por el contrario, en situaciones de hipoxia las PHDs no pueden hidroxilar las subunidades HIF α , estabilizándose su expresión.

HIF α también puede activarse en normoxia a través de rutas de señalización oncogénicas y por mutaciones en el gen supresor de tumores *VHL*^{14,15}. En estos casos, HIF1 α juega un papel central en el cambio del metabolismo de las células tumorales de OXPHOS a glucólisis aeróbica. HIF1 activa la expresión de numerosos genes dianas implicados en el metabolismo de la glucosa, entre los que se encuentran los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 y la mayoría de las enzimas glucolíticas, destacando la activación de la hexoquinasa 2 (HK2) y LDHA. Además, HIF1 activa a las piruvato deshidrogenasa quinasas (PDKs), enzimas clave en la regulación del destino del piruvato. Las PDKs fosforilan e inactivan al complejo piruvato deshidrogenasa (PDH), que cataliza la conversión del piruvato en acetil-CoA. Finalmente, la activación de las PDKs por parte de HIF1 conduce a la disminución del flujo de entrada de piruvato en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), favoreciendo la conversión de piruvato en lactato¹⁶.

La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) es un regulador clave de los procesos metabólicos. Es un inhibidor de mTOR que conecta el estado energético de las células con las señales de crecimiento. En concreto, en situaciones de estrés energético, definidas por una proporción elevada de AMP/ATP, AMPK es activada por la quinasa del hígado B1 (LKB1). Una vez activada, AMPK promueve el metabolismo oxidativo e inhibe la proliferación celular¹⁷⁻¹⁹. Tanto mutaciones de pérdida de función en las enzimas AMPK y LKB1 como la activación de rutas de señalización oncogénicas que disminuyan la actividad de AMPK, provocan la descoordinación entre las señales de crecimiento y disponibilidad de nutrientes, permitiendo la proliferación de las células tumorales en condiciones de limitación de nutrientes¹⁹.

El supresor de tumores p53 se conoce fundamentalmente por su papel en la respuesta a daño del ADN y en la regulación de la apoptosis, pero también está implicado en la regulación del metabolismo. En primer lugar, p53 inhibe la glucólisis aumentando la expresión del regulador de glucólisis y apoptosis inducible por p53 (TIGAR), el cual disminuye los niveles de fructosa-2,6-bisfosfato, actuando como un regulador negativo de la glucólisis²⁰. Por otra parte, p53 regula negativamente a la enzima glucolítica fosfoglicerato mutasa (PGM), la cual cataliza la conversión del 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato²¹. Además, p53 activa la expresión de la proteína síntesis de citocromo C oxidasa 2 (SCO2), que codifica para una chaperona transportadora de cobre que participa en el ensamblaje del complejo citocromo C oxidasa de la cadena respiratoria. De este modo, p53 actúa como un inductor de la

fosforilación oxidativa, por lo que la pérdida de p53 favorecería el cambio del metabolismo celular a glucólisis aeróbica²².

El factor de transcripción MYC es un proto-oncogen que regula los procesos de crecimiento celular y proliferación, estando implicado también en la regulación del metabolismo celular. Se ha descrito que MYC colabora con HIF1 en la activación de varios transportadores de glucosa, enzimas de la glucólisis, LDHA y PDK1, favoreciendo el fenotipo glucolítico^{23,24}. Sin embargo, MYC también activa la expresión de genes implicados en la biogénesis mitocondrial y en el metabolismo de la glutamina²⁵.

La vía de PI3K es una de las rutas más importantes en procesos tumorales. Uno de sus efectores fundamentales, AKT1, es un activador de la glucólisis. AKT1 está implicado en el aumento de expresión de los transportadores de glucosa y en la fosforilación de enzimas glucolíticas clave, como HK2 y la fosfofructoquinasa 2 (PFKM2). Además, AKT1 fosforila e inhibe a la proteína tuberina (TSC2), inhibidor de mTOR, activando la ruta de mTOR. Esta ruta estimula la biosíntesis de ribosomas y también regula indirectamente procesos metabólicos al activar determinados factores de transcripción, como HIF1⁶.

2.3. Tumores oxidativos

No todas las células tumorales basan su metabolismo en el efecto Warburg, algunas presentan el fenotipo contrario y obtienen energía mediante la fosforilación oxidativa fundamentalmente. Se ha descrito la existencia de tumores que presentan fenotipo oxidativo, entre los que se encuentran algunos tipos de linfomas, melanomas y glioblastomas²⁶⁻²⁹. La existencia de distintos perfiles metabólicos en distintos tipos de tumores, e incluso entre las distintas células de un mismo tumor, depende de la naturaleza de los oncogenes activados y del microambiente tumoral. La glucólisis aeróbica es una característica de las células tumorales que se encuentran en un microambiente con altas concentraciones de glucosa. Por el contrario, las células tumorales rodeadas por un microambiente con poca disponibilidad de glucosa recurren a la fosforilación oxidativa³⁰. Además, al ser el microambiente tumoral dinámico, algunas células tienen la capacidad de cambiar su metabolismo de glucólisis aeróbica a OXPHOS o *viceversa* en función de la disponibilidad de nutrientes. Esta capacidad se conoce como flexibilidad metabólica. El oncogén MYC está relacionado con el concepto de flexibilidad metabólica, ya que en función del microambiente tumoral puede promover la glucólisis aeróbica, activando la expresión de genes glucolíticos, o

la vía de OXPHOS, induciendo la expresión de genes involucrados en la oxidación mitocondrial de la glutamina³¹.

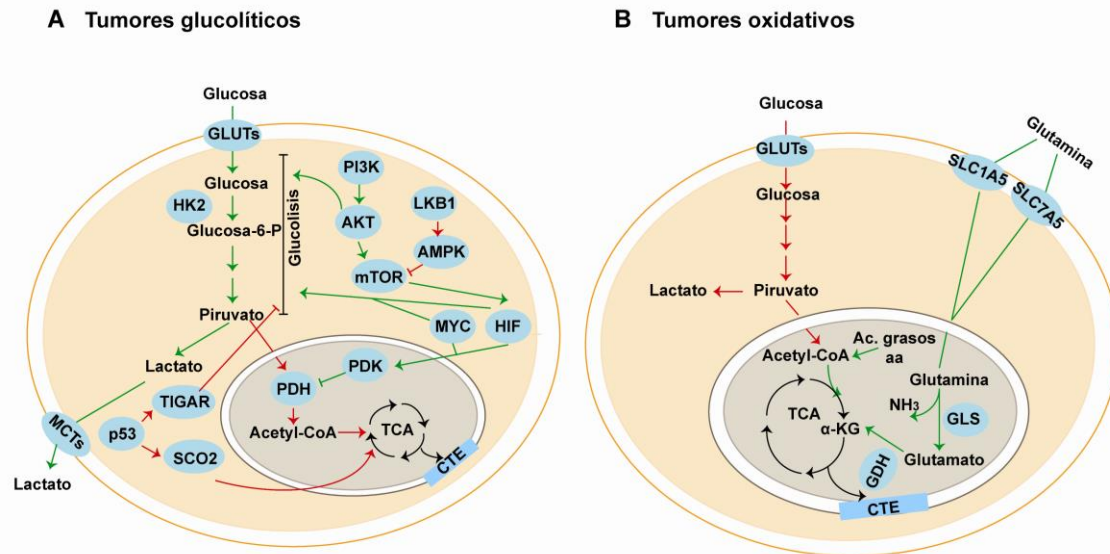


Figura 1. Vías de señalización implicadas en la regulación del metabolismo de las células tumorales. Las rutas metabólicas activas se representan con flechas de color verde y las rutas inactivas se representan con flechas de color rojo. **(A) Metabolismo de tumores glucolíticos.** La activación de la vía de PI3K y la inactivación de la vía de LKB1-AMPK provocan la activación mTOR. mTOR induce la expresión de HIF1. HIF1 y MYC cooperan para aumentar la expresión de las enzimas glucolíticas, LDHA y PDK, favoreciendo la conversión del piruvato en lactato en vez de en acetyl-CoA. La pérdida de p53 se traduce en una menor inhibición de las glucólisis y una menor producción de SCO2, chaperona importante en el ensamblaje de la cadena de transporte de electrones (CTE). **(B) Metabolismo de tumores oxidativos.** Predomina el uso de la glutamina y los ácidos grasos como fuente energética. La glutamina es transformada en α -KG por la acción de las enzimas GLS y GDH. El α -KG entra en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para producir energía en forma de ATP e intermediarios para la biosíntesis de macromoléculas. Los ácidos grasos y aminoácidos son transformados en acetyl-CoA para continuar su oxidación en el TCA.

Entre los mecanismos moleculares que participan en el metabolismo oxidativo se encuentran la activación de la biogénesis mitocondrial, la estimulación de la oxidación de ácidos grasos, la activación de las rutas de degradación de aminoácidos y la inducción de la glutaminólisis, proceso metabólico fundamental en el metabolismo de las células tumorales que consiste en la transformación de la glutamina en α -cetoglutarato (α -KG)³². La glutamina entra en la célula a través de los transportadores SLC1A5 y SLC7A5 y es transformada en glutamato y amonio por la enzima glutaminasa (GLS). A continuación, el glutamato es transformado en α -KG por la acción de la enzima glutamina deshidrogenasa (GDH) y entra en el ciclo de Krebs para producir ATP y precursores para la síntesis de aminoácidos, nucleótidos y lípidos (Figura 1B). Además de producir energía y proporcionar intermediarios para la síntesis de macromoléculas, la glutaminólisis participa en el mantenimiento del balance redox mediante la producción de glutatión (GSH) y NADPH, dos de los principales agentes reductores de las células³³.

Las rutas de señalización que promueven el cambio metabólico a OXPHOS tienen que incluir la acción de factores de transcripción y co-activadores que alteren la expresión de los componentes de la vía de OXPHOS, como el co-activador del receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas (PGC-1 α) y CREB³⁰, pero aún no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares que provocan este cambio.

3. Papel de PGC-1 α en la regulación del metabolismo celular

PGC-1 α , producto del gen *PPARGC1A*, es el primer miembro que se descubrió de la familia de coactivadores de transcripción compuesta por PGC-1 α , PGC-1 β y PRC. Estos coactivadores tienen una estructura proteica similar y regulan procesos metabólicos. PGC-1 α es un coactivador que se une a factores de transcripción potenciando su actividad, pero no tiene capacidad para unirse directamente al ADN. Se identificó en primer lugar su unión al receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas (PPAR γ)³⁴, regulador importante en la diferenciación de los adipocitos. Posteriormente, se ha descrito la interacción entre PGC-1 α y varios factores de transcripción y receptores nucleares de hormonas entre los que se encuentran los factores nucleares de respiración (NRF-1 y NRF-2), el receptor de estrógenos-relacionados alfa (ERR α), el represor Yin Yang 1 (YY1), los receptores gamma activados por el factor proliferador de peroxisomas alfa y beta (PPAR α y PPAR β), el receptor de hormona tiroidea beta (TR β 1) y el factor potenciador específico de miocito 2C (MEF2C). Mediante su unión a estos factores de transcripción PGC-1 α regula la biogénesis de las mitocondrias y sus funciones, como la respiración mitocondrial, la oxidación de ácidos grasos y la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS)³⁵⁻³⁷. De este modo, PGC-1 α se expresa mayoritariamente en tejidos con alto contenido en mitocondrias y gran capacidad oxidativa, como el corazón y el tejido adiposo marrón, y en menor medida en músculo esquelético y riñón, induciéndose su expresión rápidamente en condiciones de demanda energética y metabólica, como en situaciones de ejercicio físico, frío o limitación de nutrientes.

Al regular la actividad de todos estos factores de transcripción, PGC-1 α controla la expresión de una amplia red de genes y conecta las señales fisiológicas con la regulación de la biogénesis mitocondrial (Figura 2). Esta conexión se lleva a cabo en parte mediante modificaciones postraduccionales de PGC-1 α . Por ejemplo, la limitación de nutrientes detectada por la enzima sirtuina 1 (SIRT1), deacetilasa de histonas dependiente de NAD, provoca la desacetilación de varios residuos de lisina de PGC-1 α en respuesta a bajas concentraciones de glucosa, promoviendo así la

oxidación mitocondrial de ácidos grasos³⁸. La enzima AMPK también actúa sobre PGC-1 α , fosforilándola en residuos específicos de serina y treonina e induciendo la expresión de genes mitocondriales³⁹. Por último, varias citoquinas (CKs), como IL-1 β y combinaciones de IL-1 α y TNF α , producen la activación de p38 MAP quinasa por MKK6E. Una vez activada, p38 fosforila a PGC-1 α aumentando así la estabilidad y la actividad transcripcional de PGC-1 α ⁴⁰.

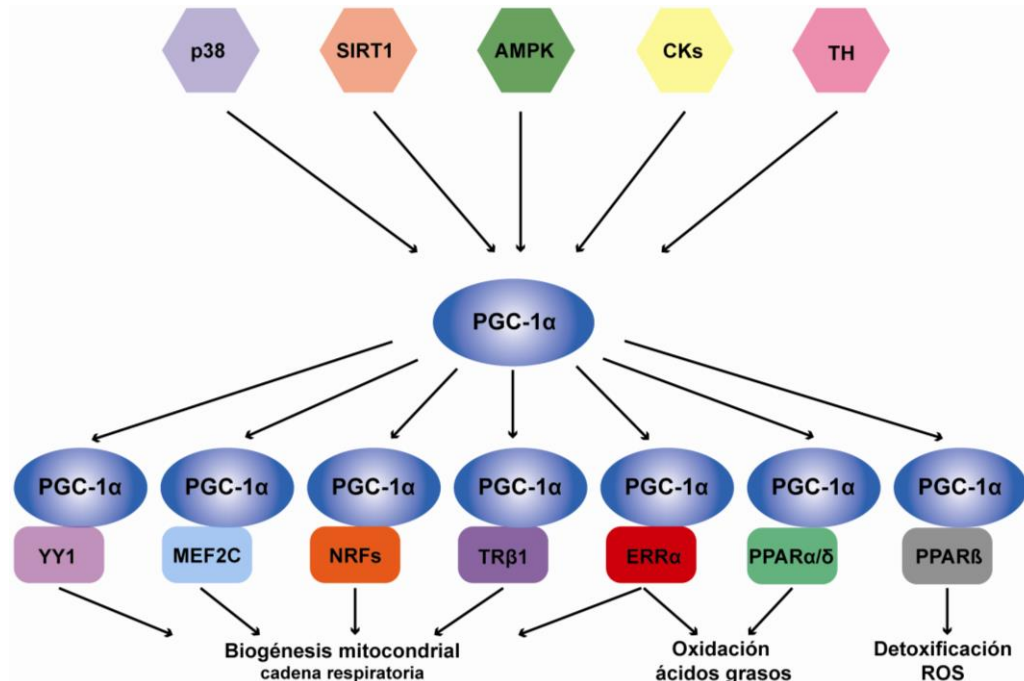


Figura 2. Vía de señalización de PGC-1 α . La expresión y/o activación de PGC-1 α está regulada por la hormona tiroidea (TH), p38, SIRT1, AMPK y CKs. Una vez activada, PGC-1 α co-activa a diversos factores de transcripción para regular el proceso de biogénesis de las mitocondrias y sus funciones, como el funcionamiento de la cadena respiratoria, la oxidación de los ácidos grasos y la detoxificación de ROS.

La expresión alterada de PGC-1 α está asociada con varias enfermedades crónicas y en los últimos años también se ha demostrado su papel como regulador en el desarrollo del cáncer. En este escenario, PGC-1 α actúa como un sensor de estrés de las células tumorales, activándose por ausencia de nutrientes, daño oxidativo y quimioterapia. Al participar en el mantenimiento de la homeostasis metabólica, PGC-1 α promueve la supervivencia de las células tumorales en microambientes restrictivos y metástasis⁴¹. Además de actuar como coactivador en la regulación de procesos metabólicos de las células tumorales, PGC-1 α está regulado por oncogenes y factores de transcripción que intervienen en procesos tumorales. Se ha descrito que PGC-1 α está sobreexpresado en un subconjunto de melanomas por acción oncogénica del factor de transcripción asociado con microftalmia (MIFT). Estos tumores presentan un aumento del metabolismo mitocondrial y de la detoxificación de ROS, permitiendo la supervivencia de las células tumorales en condiciones de estrés. Por este motivo, se

ha propuesto el uso de PGC-1 α como biomarcador para el uso de inhibidores de la respiración en el tratamiento de tumores oxidativos⁴².

4. Rastreo genético por pérdida de función en ausencia de glucosa

Se conocen muchos de los mecanismos moleculares implicados en la reprogramación metabólica a glucólisis aeróbica cuando la concentración de glucosa no es limitante, pero no hay mucha información acerca de los factores implicados en el cambio metabólico cuando no hay suficiente glucosa en el microambiente tumoral. Por este motivo, con el fin de identificar señales que puedan superar limitaciones ambientales y aportar un nuevo rumbo en la evolución del tumor, realizamos un rastreo genético por pérdida de función utilizando una librería de ADNc en antisentido para identificar genes críticos en ausencia de glucosa⁴³. Los fragmentos antisentido que permitieron el crecimiento en ausencia de glucosa fueron seleccionados y se identificaron los genes contra los que iban dirigidos dichos antisentidos (Figura 3). Se identificó un fragmento antisentido contra *MYBBP1A* de 220 nucleótidos localizado en la región 902-1122 de la secuencia codificante del gen. Este antisentido reducía los niveles de la proteína al 50% provocando un evento genético estable que proporcionaba a las células la capacidad de crecer en estas condiciones restrictivas.

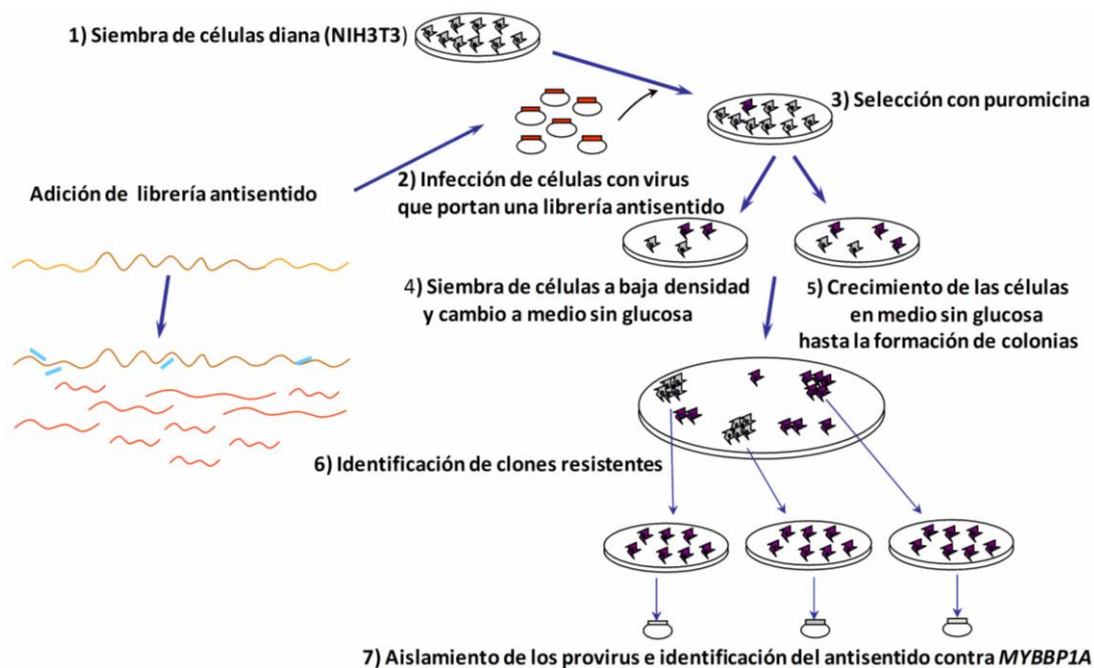


Figura 3. Rastreo genético realizado para encontrar nuevos genes supresores de tumores implicados en la superación de condiciones restrictivas. Esquema experimental seguido en la identificación de genes que regulan el crecimiento en ausencia de glucosa. Se generó una librería de fragmentos antisentido al azar a partir de ARN polyA total, estos fragmentos se clonaron en un vector retroviral pMARXIVpuro. Se infectaron fibroblastos NIH3T3 en crecimiento exponencial con retrovirus que portaban la librería. Tras seleccionar con puromicina, se sembraron las células a baja densidad en medio de cultivo sin glucosa. Tras pasar un periodo de 15 días, las colonias resistentes capaces de crecer en ausencia de glucosa fueron aisladas. Los provirus independientes que portaban un fragmento antisentido individual se aislaron y se validaron.

5. Proteína 1A de unión a MYB

La proteína 1A de unión a MYB (MYBBP1A, por sus siglas en inglés *Myb binding protein 1A*), también conocida como p160, es una proteína de 160 kDa que se expresa en todos los tejidos. Se localiza predominantemente en el nucléolo, aunque también se ha observado su presencia en el nucleoplasma⁴⁴. Contiene secuencias de localización nuclear y nucleolar (NLS) en el extremo C-terminal (Figura 4A) y se encuentra anclada al nucléolo a través del ARN, produciéndose su translocación del nucléolo al nucleoplasma cuando hay una disminución en el contenido de ARN por señales de estrés, entre las que se encuentran la ausencia de glucosa o la inhibición de la síntesis de ribosomas^{45,46}. Además, el estrés ribosómico induce el procesamiento de MYBBP1A en sus formas acortadas de 140 kDa y 67 kDa, las cuales se encuentran en el nucleoplasma por perder la señal de localización nucleolar.

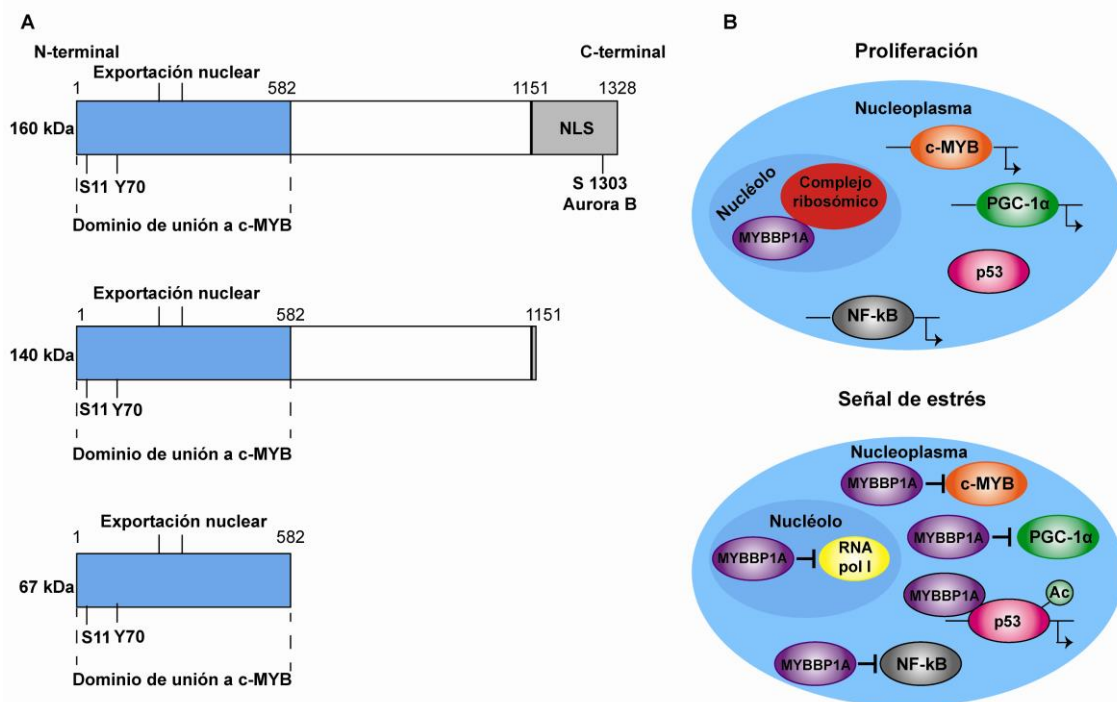


Figura 4. Estructura y modelo de translocación de MYBBP1A. (A) Esquema de los dominios y sitios de fosforilación de MYBBP1A y sus formas acortadas producidas por corte proteolítico. NLS: secuencia de localización nuclear y nucleolar. **(B) Modelo propuesto por Hochstatter et al.** MYBBP1A se localiza en el nucléolo de las células proliferativas unida al complejo ribosómico. Sin embargo, en células sometidas a alguna señal de estrés, MYBBP1A se transloca mayoritariamente al nucleoplasma, donde se une a distintos factores de transcripción para interrumpir la progresión del ciclo celular, la proliferación y la producción de energía.

MYBBP1A es una proteína muy conservada evolutivamente, presentando cierta homología con la proteína Pol5p de *Saccharomyces cerevisiae*, involucrada en la producción del ARN ribosómico (ARNr)⁴⁷. Inicialmente se identificó como una proteína de unión a la proteína codificada por el proto-oncogen *c-MYB*⁴⁴ y posteriormente se ha

ido descubriendo su unión a numerosos factores de transcripción. Por este motivo, se piensa que la función de MYBBP1A es la regulación de la actividad de varios factores de transcripción, actuando como regulador de procesos biológicos fundamentales como la división celular, la proliferación y la apoptosis.

5.1. MYBBP1A como regulador de factores de transcripción

MYBBP1A se identificó en primer lugar por su unión al proto-oncogen *c-MYB*. El proto-oncogen *c-MYB* codifica para el factor de transcripción c-MYB, regulador esencial de células madres y progenitores de la médula ósea, criptas del colon y regiones neurogénicas del cerebro adulto⁴⁸. Su principal función es mantener el estado proliferativo y las características inmaduras de estas células. Las formas oncogénicas de esta proteína se generan por pérdida del extremo N-terminal, C-terminal o ambos, permaneciendo el dominio de unión al ADN y la región necesaria para la transactivación de la transcripción. En el extremo C-terminal se encuentra el dominio NRD, el cual regula negativamente la transactivación y unión de la proteína al ADN⁴⁹. Tanto MYBBP1A como su forma acortada de 67 kDa, generada por corte proteolítico en algunos tipos celulares, se unen al NRD de c-MYB. Esta unión se produce a través de los motivos de cremalleras de leucina presentes en el fragmento N-terminal de MYBBP1A y en el NRD de c-MYB⁴⁴.

También se ha descrito que MYBBP1A actúa como represor de PGC-1 α . Tanto el dominio N-terminal como el C-terminal de MYBBP1A se unen al dominio de regulación negativa de PGC-1 α y reducen su capacidad para estimular la respiración mitocondrial y la expresión de los genes de la cadena de transporte de electrones. Esta regulación negativa se inhibe cuando PGC-1 α es fosforilada por p38 MAP quinasa⁵⁰.

Otro factor de transcripción regulado por MYBBP1A es PREP1⁵¹. Tanto la versión de 160 kDa como la de 67 kDa de MYBBP1A se unen al primer dominio de homología (HR1) de PREP1, inhibiendo su actividad transcripcional y la expresión del gen *HoxB2* en las células NT2-D1 tratadas con ácido retinoico. Para unirse a PREP1, MYBBP1A compite con PBX1. MYBBP1A también compite con p300 por la unión a la subunidad RelA/p65 de NF- κ B, actuando como represor de su actividad cuando se produce la unión⁵². Además *Mybbp1a* actúa como un co-represor de CRY1 en el promotor de *period2*, inhibiendo la expresión de este gen implicado en la regulación del reloj circadiano⁵³. Por otro lado, MYBBP1A también actúa como activador de algunos factores de transcripción, entre los que se encuentra el receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR)⁵⁴.

También se ha descrito que MYBBP1A juega un papel importante en la acetilación y activación de p53^{45,55-59}. Bajo condiciones de estrés en el nucléolo, producido por la inhibición de la síntesis de ribosomas o por ausencia de glucosa, la transcripción del ARNr se bloquea y se reduce el contenido de ARN en el nucléolo. Esta disminución provoca la translocación de MYBBP1A al nucleoplasma, donde facilita la interacción entre p53 y p300 aumentando la acetilación de p53. Concretamente, el modelo propuesto expone que el estrés en el nucléolo provoca la inactivación de HDM2, lo que conlleva la estabilización de p53 y la formación de dímeros de p53 no acetilados. Una vez translocado al nucleoplasma, MYBBP1A se une a estos dímeros de p53 a través de su región central (aa 643-1150) y C-terminal (aa 1151-1328). Tras producirse esta interacción, se forman dímeros entre unidades de MYBBP1A unidas a los dímeros de p53, dando lugar a la formación de tetrámeros de p53. El co-activador de transcripción p300 se une a estas estructuras, acetila las unidades de p53 y MYBBP1A se disocia del complejo. Por último, el tetrámero de p53 acetilado, unido aún a p300, se une a los promotores de sus genes diana e induce la expresión de genes relacionados con apoptosis y/o parada del ciclo celular⁵³.

Finalmente, también se ha estudiado la unión de MYBBP1A a factores implicados en regulación epigenética. Se ha descrito que MYBBP1A es un componente del complejo remodelador de cromatina dependiente de ATP (esBAF), el cual se asocia con procesos de diferenciación y fenotipo de célula madre. Aunque el papel de MYBBP1A en este complejo no está claro, podría estar relacionado con funciones de regulación epigenética⁶⁰. Asimismo, se ha demostrado que MYBBP1A actúa como regulador de la expresión génica específica del músculo y la diferenciación de los mioblastos mediante su unión a MyoD. La unión de MYBBP1A y MyoD en determinadas regiones de genes que no se expresan en el tejido muscular disminuye la actividad transcripcional de MyoD. Se ha propuesto que MYBBP1A lleva a cabo esta función represora mediante el reclutamiento de modificadores epigenéticos negativos, como HDAC1/2 y Suv39h1, induciendo una estructura de la cromatina menos accesible⁶¹.

5.2. Papel de MYBBP1A en el desarrollo embrionario

La función de MYBBP1A ha sido estudiada por Mori et al. *in vivo*⁶². Para ello, delecionaron el gen *mybbp1a* en ratones y obtuvieron ratones heterocigotos *mybbp1a*^{+/-} sanos y fértiles, pero no consiguieron generar ningún ratón *mybbp1a*^{-/-}. Tras analizar en profundidad los embriones en distintos momentos de desarrollo, a los días 6,5, 9,5 y 11,5, no encontraron embriones homocigotos *mybbp1a*^{-/-}. También

aislaron blastocitos de los ratones heterocigotos, los mantuvieron en cultivos varios días y los genotiparon sin detectar ningún blastocito *mybbp1a*^{-/-}. Estos resultados indican que *mybbp1a* es esencial durante las primeras etapas del desarrollo embrionario de los ratones, concretamente antes de la formación del blastocito.

5.3. Papel de MYBBP1A en mitosis

Existen varias observaciones que sugieren que MYBBP1A participa en la regulación de la mitosis. Se ha descrito que MYBBP1A se transloca del nucléolo al nucleoplasma durante la mitosis, situándose en regiones de para-cromosomas en metafase-anáfase, donde co-localiza con el marcador de cromatina fosfohistona H3⁶². Además, MYBBP1A es fosforilada por la quinasa Aurora B en el residuo de serina 1303⁶³. El pico de esta fosforilación se produce en la transición G2/M y se inhibe por completo cuándo se tratan las células con Danusertib, un inhibidor de las quinasas Aurora. Esta fosforilación de MYBBP1A en G2/M la realiza la quinasa Aurora B exclusivamente, ya que únicamente el silenciamiento de Aurora B y no A o C suprime esta fosforilación. Asimismo, se ha propuesto que MYBBP1A forma parte de un conjunto de proteínas implicadas en la progresión de la mitosis, ya que la reducción de la expresión de MYBBP1A por ARN de interferencia (ARNi) provoca tanto el retraso de la progresión de la mitosis como fallos en el ensamblaje y la estabilidad del huso mitótico.

También se ha descrito que la disminución de la expresión de MYBBP1A mediante silenciamiento génico en células Hela reduce el crecimiento celular e incrementa la apoptosis, produciéndose el bloqueo de las células que sobreviven en la transición G2/M del ciclo celular. Al comparar células con niveles reducidos de MYBBP1A con respecto a las células control se observa un aumento de la expresión de genes que inhiben el ciclo celular (CDKN1A, GADD45B y SFN) y la disminución de genes implicados en la reparación del ADN (TOP2A, TOP2B, BRCA1, CDK7 y WEE1). Sin embargo, la disminución de la expresión de MYBBP1A en células NIH3T3 tiene el efecto contrario, la estimulación del crecimiento celular⁶².

Durante la mitosis el núcleo se rompe y las proteínas nucleolares se translocan al citoplasma. Entre estas proteínas se encuentra MYBBP1A, que como se ha mencionado induce la acetilación de p53, siendo esta interacción esencial en el punto de control post-mitótico G1. En este contexto, MYBBP1A participa en la activación de la maquinaria del punto de control cuando la mitosis se prolonga más de lo normal⁶⁴.

5.4. Papel de MYBBP1A en senescencia

Varios datos experimentales apuntan a que MYBBP1A podría estar involucrado en la senescencia celular. En primer lugar, se ha demostrado que MYBBP1A regula la actividad, mediante interacción física, de dos factores clave en el proceso de senescencia: p53 y la subunidad RealA/p65 de NF- κ B^{52,57}. En segundo lugar, se ha expuesto que la pérdida de MYBBP1A afecta a la expresión de genes implicados en ciclo celular y respuesta a daño en el ADN, estando algunos de estos genes implicados en senescencia celular también⁶². Por último, se ha descrito que MYBBP1A se transloca al nucleoplasma en respuesta a daño en el ADN, disminuyendo posteriormente sus niveles en células senescentes⁶⁵. También se ha observado que el silenciamiento de *MYBBP1A* por sí mismo no induce senescencia, pero el silenciamiento de *MYBBP1A* junto con el tratamiento con etopósido provoca un aumento del número relativo de células senescentes. Además, el silenciamiento de *MYBBP1A* aumenta la resistencia a radioterapia⁶⁵.

5.5. Papel de MYBBP1A en la regulación del estado energético intracelular

Se ha propuesto que el nucléolo actúa como un sensor que conecta el estado energético intracelular con la maquinaria del ciclo celular, siendo MYBBP1A un componente importante de este sensor⁴². Las células reducen el consumo energético e inducen la parada de ciclo celular cuando existe deficiencia energética con el fin de sobrevivir. En respuesta a la ausencia de glucosa, que se traduce en escasez energética, el complejo silenciador nucleolar dependiente de energía (eNoSC), constituido por las proteínas NML, SIRT1 y SUV39H1, evalúa el estado energético intracelular en base a la relación NAD⁺/NADH. En situaciones de escasez energética, definida por una proporción elevada de NAD⁺/NADH, eNoSC se activa a través de la SIRT1 y suprime la transcripción de ARNr. Esto conduce a una reducción de la cantidad de ARN nucleolar que provoca la translocación de MYBBP1A al nucleoplasma. Finalmente, la translocación de MYBBP1A aumenta la acetilación de p53. De este modo, eNoSC actúa como detector y transductor del estado energético intracelular mientras que MYBBP1A realiza el papel de efector activando p53 mediante el aumento de su acetilación.

Así, la vía eNoSC-MYBBP1A emerge como una alternativa a la vía LKB1-AMPK. Ambas rutas conducen a la supresión de la biogénesis de ribosomas en respuesta al descenso energético mediante distintos mecanismos, en el caso de la ruta LKB1-AMPK a través de la inhibición de la actividad de mTOR⁶⁶. Además, AMPK también induce la activación de p53 aumentando la fosforilación de los residuos de serina 15 y

46¹⁷. El significado biológico de la existencia de estas dos rutas y el papel de cada una de forma independiente no está claro, aunque ambas podrían compensarse mutuamente mejorando su eficiencia.

5.6. Papel de MYBBP1A en la síntesis de ribosomas

La función de MYBBP1A también se ha estudiado en el contexto de la expresión de genes ribosómicos^{67,68}. MYBBP1A se asocia con el complejo ARN polimerasa I y actúa como un regulador negativo de la transcripción del ADNr y como parte activa de la maquinaria de la biogénesis de ribosomas⁶⁷. Estudios de ganancia y pérdida de función sugieren que MYBBP1A juega un doble papel en el metabolismo del ARNr. En primer lugar regulando el inicio de la transcripción y en segundo lugar participando en el procesamiento adecuado del pre-ARNr. La sobreexpresión de MYBBP1A reduce la carga de la ARN polimerasa I en los genes ribosómicos. Por el contrario, la reducción de MYBBP1A produce la acumulación del precursor del ARNr, 47S pre-ARN, *in vivo*. Se ha propuesto que la acumulación de este precursor es una consecuencia del aumento de la transcripción por falta de represión de la expresión de genes ribosómicos y por fallos en el procesamiento del ARNr.

En relación al mecanismo mediante el cual MYBBP1A regula la expresión de los genes ribosómicos, se ha descrito que MYBBP1A tiene una función epigenética⁶⁶. En concreto, se ha propuesto que MYBBP1A mantiene las repeticiones del ADNr silenciadas mediante su asociación con HDAC1/2, ya que la reducción de MYBBP1A disminuye los niveles de metilación del ADN y los marcadores de histonas asociados con el silenciamiento génico, alterando la ocupación de los promotores de algunos genes como UBF y HDACs y aumentando la expresión del ARNr.

Finalmente, considerando que la transcripción de los genes ribosómicos, el procesamiento del pre-ARNr y el ensamblaje de los ribosomas son los procesos celulares que consumen más energía, la tasa de biogénesis de ribosomas está directamente relacionada con la proliferación celular. En base a esta observación, se ha propuesto el siguiente modelo⁶⁷(Figura 4B): MYBBP1A se encuentra principalmente asociado a complejos pre-ribosómicos en células proliferativas, donde actuaría como base para el correcto procesamiento del ARNr y para el ensamblaje de factores necesarios para la biogénesis de los ribosomas. Tanto niveles bajos de síntesis de ribosomas en respuesta a señales de estrés como una demanda reducida de ribosomas conducirían al desmantelamiento de las partículas pre-ribosómicas y a la translocación de MYBBP1A al nucleoplasma. Aunque permanezca una pequeña fracción de MYBBP1A en el nucléolo reprimiendo la actividad de la RNA polimerasa I,

la mayoría de las unidades de MYBBP1A estarían en el nucleoplasma, donde regularían la actividad de factores de transcripción como c-MYB, PGC-1 α , NF- κ B y p53 para interrumpir la progresión del ciclo celular, la proliferación y la producción de energía.

5.7. Regulación de MYBBP1A

Se ha identificado mediante la técnica de análisis proteómico ICAT que MYBBP1A es una diana de ubiquitinación del gen supresor de tumores *VHL*⁶⁹. Este gen codifica para un componente del complejo proteico E3 ubiquitina-ligasa. Mutaciones de pérdida de función en este gen están asociadas a la enfermedad de von Hippel-Lindau, síndrome de cáncer hereditario caracterizado por alto riesgo de desarrollar tumores muy vascularizados en ojos, cerebro y espina dorsal, así como tumores benignos o malignos en riñón, páncreas y médula adrenal⁷⁰. La inactivación bialélica de *VHL* es también frecuente en carcinomas renales y hemangioblastomas esporádicos^{70,71}. Se ha descrito que pVHL se une directamente a MYBBP1A provocando su degradación de forma dependiente de hierro y del proteasoma⁶⁹. La región de MYBBP1A localizada entre los aminoácidos 632 y 694 es necesaria para que se produzca esta degradación, la cual contiene una secuencia parecida a la que rodea al residuo de prolina que se hidroxila en la proteína HIF-1 α para su degradación vía pVHL. También se ha descrito que la mutación en el residuo de prolina 693 de MYBBP1A (Pro693) que provoca su cambio a alanina bloquea la degradación de MYBBP1A por pVHL. En base a esto se ha propuesto que el residuo Pro693 de MYBBP1A es hidroxilado en presencia de hierro y oxígeno, conduciendo a su ubiquitinación por pVHL y a su posterior degradación vía proteasoma.

Sin embargo, pVHL no es la única proteína implicada en la regulación de MYBBP1A. PREP1 controla la vida media de MYBBP1A a nivel de estabilidad de proteína, ya que la interacción entre PREP1 y MYBBP1A impide su degradación vía proteasoma. Existen diferentes evidencias experimentales que demuestran esta regulación. Por ejemplo, el músculo de ratones hipomórficos para *prep1* presenta niveles reducidos de Mybbp1A. Por el contrario, tienen un aumento de Pgc-1 α tanto a nivel de ARNm como de proteína, acompañado del aumento de la expresión del transportador Glut4, responsable de la absorción de glucosa estimulada por insulina en el músculo⁷². También se ha descrito que Prep1 es un regulador directo e indirecto de los componentes de la fosforilación oxidativa y que Mybbp1a participa en los mecanismo indirectos. La eliminación de *Prep1* específicamente en el músculo de ratones provoca un aumento en la expresión de los genes de la cadena respiratoria,

de la capacidad mitocondrial y de los niveles de expresión de Pgc-1 α , junto con una reducción significativa de los niveles de Mybbp1a⁷³.

5.8. MYBBP1A y cáncer

El gen que codifica para MYBBP1A se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 17, concretamente en la región 17p13.3 entre los marcadores D17S1828 y D17S938. La pérdida de heterocigosidad en la región 17p13.3 se observa con alta frecuencia (50-80%) en distintos tipos de cáncer, entre los que se encuentran el cáncer esporádico de mama y ovario, meduloblastomas, astrocitomas, osteosarcomas, leucemias, cáncer de vejiga y de pulmón⁷⁴. Esta pérdida de heterocigosidad sugiere la presencia de uno o más genes supresores de tumores en la región 17p13.3 y *MYBBP1A* podría ser uno de ellos.

Actualmente ya se han descrito algunos contextos en los que *MYBBP1A* actúa como un gen supresor de tumores. Por ejemplo, la reducción de la expresión de *MYBBP1A* en la línea celular NIH3T3 induce el aumento del crecimiento celular e incrementa la tumorigénesis mediada por RasV12⁶². También se ha identificado una doble función de MYBBP1A en la proliferación y en la migración de las células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello⁷⁵. Se ha observado una reducción significativa de los niveles de Mybbp1a en tumores recurrentes de ratones en comparación con los tumores primarios, observándose el mismo resultado en el 50% de las muestras de tumores humanos analizadas. Sorprendentemente, el silenciamiento de *MYBBP1A* en la línea celular de ratón SCC7 y en varias líneas celulares humanas de este tipo de carcinoma incrementaba la migración de las células pero disminuía el crecimiento celular. Por este motivo, se ha propuesto que las células tumorales con niveles reducidos de MYBBP1A podrían representar una sub-población de células de crecimiento lento pero con gran capacidad migratoria implicada en la recaída y metástasis.

El análisis de la base de datos Oncomine revela que la expresión de MYBBP1A correlaciona negativamente con la tumorigénesis en cáncer de mama⁷⁶. Además, experimentos *in vivo* e *in vitro* realizados en líneas celulares de cáncer de mama con expresión normal de p53 muestran un aumento de la tumorigénesis, de la formación de colonias y de la resistencia a anoikis cuando se silencia la expresión de *MYBBP1A*. En este caso, MYBBP1A podría tener un papel importante en la prevención de formación de tumores en relación a la activación de p53. En condiciones de baja adherencia, MYBBP1A se transloca del nucléolo al nucleoplasma aumentando la

anoikis dependiente de p53, impidiendo de este modo el proceso de formación tumoral.

Ensayos de *microarrays* de tejidos en tumores primarios de pacientes con cáncer de orofaringe muestran una correlación significativa entre bajos niveles de expresión de MYBBP1A y altos niveles de p-AKT Ser473 en pacientes con peor supervivencia libre de enfermedad y peor supervivencia global⁶⁵. Aunque es necesario hacer más estudios, los autores de este trabajo sugieren que la correlación observada podría ser un indicador de alto riesgo de fallo del tratamiento actual en pacientes con cáncer de orofaringe.

También se ha descrito que MYBBP1A es un regulador negativo de la sirtuina 7 (SIRT7)⁷⁷. Se ha observado que MYBBP1A se une a SIRT7 tanto *in vitro* como *in vivo* e inhibe la actividad deacetilasa de la SIRT7 sobre H3K18Ac. En esta unión intervienen los dominios N y C-terminal de SIRT7 y el dominio C-terminal de MYBBP1A. Como se ha descrito que la actividad deacetilasa de la SIRT7 sobre H3K18Ac es necesaria para el mantenimiento de las propiedades fundamentales de las células tumorales, la inhibición de SIRT7 por parte de MYBBP1A sugiere que MYBBP1A ejerce la función de supresor tumoral.

Por último, se ha identificado recientemente que MYBBP1A forma parte de la red de proteínas que interaccionan con la tripeptidil peptidasa II (TPPII). TPPII es una aminopeptidasa que participa en la regulación del ciclo celular, la apoptosis y la senescencia y parece que promueve el crecimiento descontrolado de las células tumorales. Esta red estaría compuesta por TPPII, p53, MYBBP1A, CDK2, SIRT7, SIRT6 y CD147⁷⁸. Se ha sugerido que las interacciones entre estas proteínas participarían en la regulación de la tumorigénesis, la neurodegeneración y el envejecimiento. En un estudio de interacción proteína-proteína se descubrió que TPPII interacciona físicamente con MYBBP1A y la proteína reguladora del ciclo celular CDK2. También se encontró una interacción directa entre MYBBP1A y CDK2⁷⁹.

Actualmente se ha descrito que MYBBP1A es una proteína multifuncional implicada en la regulación de varios procesos biológicos como el desarrollo embrionario, el ciclo celular, la mitosis, la biogénesis de ribosomas y el estado energético intracelular, y que realiza estas funciones uniéndose a diversos factores de transcripción. Sin embargo, aún no se ha esclarecido el papel de MYBBP1A en procesos tumorales y cuáles serían las rutas moleculares alteradas por la pérdida de MYBBP1A.

En base a los datos bibliográficos y al resultado obtenido en nuestro rastreo genético, decidimos estudiar en profundidad el papel de MYBBP1A en los procesos tumorales y en la regulación del metabolismo de las células tumorales, así como los mecanismos moleculares que podrían estar implicados. Para ello nos centramos en el estudio de la unión de MYBBP1A a c-MYB y a PGC-1 α , por sus funciones como oncogen y regulador metabólico respectivamente.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es la caracterización de MYBBP1A como un gen supresor de tumores. Para alcanzarlo, se definieron los siguientes objetivos concretos:

1. Estudio de la relevancia de la pérdida de MYBBP1A en tumores humanos.
2. Identificación del mecanismo molecular a través del cual MYBBP1A podría participar en el proceso tumoral.
3. Estudio del papel de MYBBP1A en la regulación del metabolismo celular.
4. Análisis de la expresión de *MYBBP1A* en bases de datos transcriptómicas públicas de pacientes de cáncer.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos biológicos usados

Plásmidos: los plásmidos usados en esta tesis se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Plásmidos utilizados en esta tesis

Plásmido	Secuencia	Resistencia eucariotas	Origen
pcDNA3		Neomicina	A. Carnero
pACTMYBBP1A		Neomicina	A. Carnero
pWZL		Blasticidina	A. Carnero
pWZLMYBBP1A		Blasticidina	A. Carnero
pGene Clip <i>scramble</i>	GGAATCTATTCGATGCATAC	Higromicina	Quiagen
pGene Clip shMYBBP1A1	TGGGATCCGTGAACCTATTCT	Higromicina	Quiagen
pGene Clip shMYBBP1A2	AGCAAAGGTCACCGAGGAACTT	Higromicina	Quiagen
pGene Clip shMYBBP1A3	TTCGCAGACCTCCTGTTGAAT	Higromicina	Quiagen
pGene Clip shMYBBP1A4	TCCCTGTACGCCTACTTTCT	Higromicina	Quiagen
pRetroSuper (pRS)		Puromicina	Origene
pRS shMYBBP1A	GCAGAAGGAGTTCAAGAGACTCCTTCTGC AGCTTGTTCTTTTGGAA	Puromicina	A. Carnero
pRS shPGC1 α	TCTGGTACACAAGGCAATAACTCCACCAA	Puromicina	Origene
pBABEpuro		Puromicina	A. Carnero
HA-VHL-pBabe	VHL cDNA	Puromicina	Addgene
pcDNA3-2xFlag-human-c-MYB	c-MYB cDNA	Neomicina	Shengao Jin

Todos los plásmidos llevaban ampicilina como resistencia bacteriana.

Antibióticos: puromicina (Nucliber), blasticidina (Sigma), higromicina (Lifetechnologies), G418 (Quimigen), ampicilina (Sigma).

Cepas bacterianas: todos los plásmidos utilizados en la tesis se propagaron en la cepa de *E.coli* DH5 α (Invitrogen). Se crecieron en medio LB (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de NaCl pH 7,0) a 37°C, con agitación, durante 16h.

2. Técnicas básicas de biología molecular

2.1. Transformación de células quimiocompetentes

A 100 μ l de bacterias quimiocompetentes se les añadió una cantidad apropiada de ADN (habitualmente 100 ng de plásmido purificado). La mezcla de bacterias y ADN se incubó durante 30 minutos en hielo y después se dio un choque térmico a 42°C en un termobloque durante 45 segundos. A continuación se mantuvieron las células en hielo durante 2 minutos y se añadieron 900 μ l de medio SOC (20 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa

20 mM) a temperatura ambiente. Se incubaron 1 hora a 37° C en agitación. Después se centrifugaron durante 2 minutos a 8.000 rpm y se resuspendieron en 100 µl de medio SOC. Se extendió el cultivo en placas de LB-agar con el antibiótico de selección apropiado y se incubaron a 37°C durante 16h.

2.2. Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN se puede realizar a partir de pequeños o grandes volúmenes de cultivos de bacterias, según la cantidad que necesitemos. El protocolo se basa en ambos casos en una lisis alcalina seguida de la precipitación y purificación del ADN en una columna de intercambio iónico (silice-dietilaminoetanol). El ADN se une a la columna en condiciones apropiadas de pH y baja concentración de sales, los contaminantes se eliminan en un lavado con tampón de fuerza iónica intermedia y el ADN se eluye en un tampón de alta concentración de sales. Por último, el ADN se precipita con isopropanol para concentrarlo y eliminar sales. En ambos casos utilizamos el *JetStar2.0 Plasmid purification kit* de Genomed para midi o maxi, siguiendo las instrucciones del fabricante. Describimos el protocolo brevemente a continuación. Se creció el cultivo líquido en medio selectivo (LB con el antibiótico apropiado según el plásmido) durante 12-16 h a 37°C, con agitación. El volumen de cultivo dependía de si era una maxi o midi (250 o 100 ml respectivamente). Las células se recuperaron por centrifugación durante 5 minutos y se resuspendieron en la solución de resuspensión (Tris HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, ARNasa A 100 µg/ml). Después se añadió la solución de lisis (NaOH 0,2 M, SDS 1%), mezclando por inversión e incubando 5 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se neutralizó al añadir acetato potásico 3M pH 5,5, mezclando inmediatamente. Después se centrifugó durante 10 minutos y el sobrenadante se vertió en una columna previamente equilibrada, dejándolo caer por gravedad. Después, la columna se lavó dos veces con tampón de lavado (NaCl 1 M, MOPS 50 mM pH 7,0, 15% isopropanol) y el ADN se eluyó con tampón de elución (NaCl 1,25 M, MOPS 50 mM pH 8,5, 15% isopropanol). A continuación, el ADN se precipitó por adición de isopropanol y centrifugación durante 30 minutos a 4°C. Se lavó con etanol 70% y se centrifugó durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, se secó el pellet de ADN obtenido al aire y se resuspendió en un volumen apropiado de agua destilada libre de nucleasas.

Todas las centrifugaciones de este protocolo se realizaron en una centrífuga *Evolution RC6 plus* a una velocidad de 12.000g.

3. Cultivos celulares

3.1. Líneas celulares

Las características de las líneas celulares utilizadas en el presente trabajo, incluyendo el medio de cultivo, el origen y el tipo celular que representan, se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Líneas celulares utilizadas en esta tesis

Línea celular	Especie	Tipo celular	Medio de cultivo	Crecimiento	Origen
A498	Humana	Carcinoma renal	DMEM	Adherente	CLS
ACHN	Humana	Adenocarcinoma renal	DMEM+ aa no esenciales	Adherente	CLS
786-O	Humana	Carcinoma renal	RPMI	Adherente	Carmen Blanco
CaKi-1	Humana	Carcinoma renal de células claras	RPMI	Adherente	Carmen Blanco
Phoenix A	Humana	HEK293T que expresan los genes retrovirales <i>gag-pol</i> y <i>env</i> (anfotrópico)	DMEM	Adherente	ATCC

CLS: Servicio de Líneas Celulares; ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo; aa: aminoácido.

3.2. Cultivo y conservación de las líneas celulares

Todas las líneas se cultivaron en medio DMEM o RPMI con glutamina estable, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Life technologies), 40 µg/ml de penicilina, 40 µg/ml de estreptomycin (Sigma) y 1 µg/ml de fungizona (anfotericina B; Sigma). Las células se crecieron en placas de 10 centímetros (Falcon) y se subcultivaron 1:3 -1:12, según la línea celular, cada 3-4 días mediante tratamiento con tripsina/EDTA 0,025% (Life technologies), en el caso de las líneas de carcinoma renal, o tripsina/EDTA (Sigma) en el caso de la línea Phoenix A. Las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ (Thermo Scientific). Todas las manipulaciones se hicieron en una campana de flujo laminar de Clase II Bio-II-A (nivel de seguridad biológica 2; Telstar).

Para su almacenamiento a largo plazo, las células se conservaron en un contenedor de nitrógeno líquido, en criotubos de 2 ml, en su medio de cultivo normal o FBS, con 10% de DMSO. Para periodos de almacenamiento más cortos las células se conservaron a -80°C. Para descongelar un vial, se sumergió en un baño de agua a

37°C durante 2 minutos; se centrifugó el contenido en 5 ml de medio y las células se resuspendieron en su medio de cultivo habitual.

3.3. Transfección de células

3.3.1. Transfección por precipitación con fosfato cálcico: la mezcla de CaCl_2 , ADN y tampón fosfato origina la precipitación de pequeñas partículas insolubles de fosfato cálcico que contienen el ADN condensado⁸⁰. Estos complejos se adhieren a la membrana plasmática y entran en la célula por fagocitosis.

Las células se sembraron el día anterior a la transfección de manera que estuvieran a una confluencia del 70-80% en el momento de la transfección. Entre 2 y 4 horas antes de la transfección se cambió el medio a las células, añadiendo 10 ml de medio fresco completo (para una placa de 10 cm). En un tubo de 15 ml se mezclaron 20 µg del ADN correspondiente, 50 µl de CaCl_2 2,5M y se llevó a 500 µl con agua Milli-Q estéril. A esto se le añadieron 500 µl de tampón HBS 2X (NaCl 270 mM, HEPES 55 mM, Na_2HPO_4 1,5 mM, pH 7,04) gota a gota mientras se producían burbujas con una pipeta *pasteur* de vidrio. Se dejó la mezcla durante media hora para permitir que se formasen los cristales de fosfato cálcico y se añadió sobre el cultivo celular gota a gota. Se dejaron durante 8-16 horas a 37°C y se les cambió el medio. Se incubaron hasta alcanzar las 48 horas desde el momento de la transfección a 37°C para utilizarlas según procediera en cada caso.

3.3.2. Transfección mediante el kit comercial Effectene (Quiagen): la transfección con este kit se basa en la utilización de un potenciador de la condensación del ADN y del reactivo Effectene, compuesto lipídico no liposomal que cubre el ADN condensado con lípidos catiónicos. Este método proporciona una forma eficiente de transferir el ADN dentro de células eucariotas.

Se sembraron las células en placas de 6 pocillos el día anterior, para que estuvieran a una confluencia del 50-80% en el momento de la transfección, y se siguió el protocolo indicado por el fabricante. En primer lugar se mezcló el ADN con el potenciador de la condensación del ADN y un tampón que proporcionaba las condiciones de sal óptimas para la condensación del ADN. Se incubó la mezcla durante 2-5 min. A continuación se añadió el reactivo Effectene y se incubó la mezcla durante 5-10 min para permitir la formación de los complejos Effectene-ADN. Posteriormente los complejos se mezclaron con medio completo y se añadieron directamente sobre las células, las cuales se incubaron 24-48 horas a 37°C para comenzar después el proceso de selección.

3.3.3. Transfección mediante el kit comercial TransIt-X2 (Mirus): se sembraron las células en placas de 6 pocillos el día anterior, para que estuvieran a una confluencia del 80% en el momento de la transfección, y se siguió el protocolo indicado por el fabricante. Para ello se mezclaron 2,5µg de ADN del plásmido y 250 µl de medio (cantidades para transfectar las células de un pocillo). A continuación se añadió 7,5 µl de TransIT-X2, polímero no liposomal que recubre el ADN favoreciendo su transporte al interior celular, se resuspendió con la pipeta y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió la mezcla gota a gota sobre las células, las cuales se incubaron durante 48 horas a 37°C para comenzar después el proceso de selección.

3.4. Infección retroviral

Se sembraron las células Phoenix A en placas de 10 cm el día previo, para que estuvieran a un 70-80% de confluencia en el momento de la transfección. Se llevó a cabo una transfección transitoria de estas células con el vector retroviral de interés, mediante el protocolo del fosfato cálcico (descrito en el apartado 3.3), para producir las partículas retrovirales. Tras 8-16h de incubación a 37°C, se le cambió el medio a las células (10 ml) y se dejaron 48 h a 32°C. A continuación, el sobrenadante que contenía los virus se pasó por un filtro de acetato de celulosa (0,45 µm, VWR) y se suplementó con un volumen igual de medio fresco y con 8 µg/ml de polibreno (Sigma), polication que reduce la repulsión electrostática entre el virus y la membrana celular, favoreciendo la unión de los virus. Para la infección, se reemplazó el medio de cultivo de las células receptoras por medio nuevo con el sobrenadante viral y las placas fueron centrifugadas (1 h, 1500 rpm) e incubadas a 32°C durante 8 h. Después, se cambió el medio y se mantuvieron 48 h a 37°C, momento en el que se comenzó con la selección apropiada.

3.5. Selección de células transfectadas o infectadas

Tras 48 horas de incubación se tripsinizaron las células, se sembraron a baja densidad en una placa de 10 cm en el caso de las células transfectadas, o se dividieron 1:2 en el caso de las células infectadas, y se comenzó la selección con el antibiótico apropiado. Éste se mantuvo durante el tiempo necesario para que se produjera la muerte de las células sin transfectar y se obtuvieran clones aislados en las placas de las células transfectadas. Posteriormente, se pasaron los clones a monocapa, obteniendo poblaciones celulares con la mezcla de todos los clones obtenidos en una placa. Una vez finalizada la selección, para el mantenimiento, se puede reducir la concentración del antibiótico a la mitad.

4. Ensayos celulares

4.1. Ensayos de metabolismo

Los ensayos descritos en este apartado se realizaron en medio DMEM (Corning) o RPMI (Biowest) sin piruvato, glucosa y glutamina. Según la finalidad del experimento, se suplementó el medio con glutamina estable (Glutamax, Gibco) o glucosa (Sigma) cuando fue necesario.

4.1.1. Ensayo de proliferación en condiciones limitantes de nutrientes

Se sembraron 1×10^4 células en pocillos de 35mm por triplicado en las siguientes condiciones: medio sin glucosa en normoxia, medio sin glutamina con 100mg/L de glucosa en normoxia, medio con glutamina y 100mg/L de glucosa en normoxia y medio con glutamina y 100mg/L de glucosa en hipoxia. A las 24 horas (día 0) se fijaron las células del primer punto y cada 24 horas, se fijó un punto de la curva y se cambió el medio al resto de las placas. Las células se fijaron con glutaraldehído 0,5% y se tiñeron con cristal violeta 1%. Después de lavar y dejar secar las placas, el cristal violeta se disolvió en ácido acético 15% y se cuantificó el número relativo de células midiendo la absorbancia del cristal violeta a 595 nm. Los valores se representaron refiriéndolos al día 0.

4.1.2. Cuantificación de ATP total

Se sembraron 5×10^3 células por pocillo en placas de 96 pocillos blancas con fondo plano y transparente, en medio sin glucosa y en medio sin glutamina con 100 mg/L de glucosa. Tras 18 horas, se cuantificó el ATP total con el kit ab113849 (Abcam) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadieron 50 μ l de detergente por pocillo y se colocó la placa en un agitador orbital durante 5 minutos a 700 rpm para lisar las células. A continuación, se añadieron 50 μ l de una solución que contiene luciferasa y D-luciferina y se incubó la placa durante 10 minutos en oscuridad. El ATP reacciona con la D-luciferina y la luciferasa emitiéndose luz como producto de la reacción. La luz emitida es directamente proporcional a la cantidad de ATP presente en la célula. Una vez pasados los 10 minutos de incubación, se cuantificó la luminiscencia en el lector Víctor X3 (PerkinElmer).

4.1.3. Cuantificación de la relación ATP/ADP

Se sembraron 5×10^3 células por pocillo en placas de 96 pocillos blancas con fondo plano y transparente, en medio sin glucosa y en medio sin glutamina con 100 mg/L de glucosa. Tras 18 horas, se cuantificó la relación ATP/ADP total con el kit

MAK135 (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo constaba de dos pasos. En el primer paso se eliminó el medio de cultivo de los pocillos y se añadieron 90 µl de la solución ATP. Esta solución contenía detergente, luciferasa y D-luciferina. Las células se lisan con el detergente liberándose el ATP y ADP intracelular. El ATP reacciona con la D-luciferina y la luciferasa emitiéndose luz como producto de la reacción, la cual es proporcional a la cantidad inicial de ATP. Se incubó la placa durante 1 minuto a temperatura ambiente y se cuantificó la luminiscencia (RLU_A) en un lector de placas. Se dejó la placa durante 10 minutos en oscuridad y se comenzó el segundo paso, en el que se transformó el ADP en ATP por reacción enzimática. Para ello se midió la luminiscencia de la placa de nuevo para calcular la luminiscencia de basal (RLU_B) antes de transformar el ADP. A continuación se añadieron 5 µl de la enzima ADP, que transforma el ADP en ATP, el cual reaccionó de nuevo con la luciferasa y la D-luciferina como en el primer paso. Finalmente, se incubó la placa durante 1 minuto a temperatura ambiente, se midió la luminiscencia (RLU_C) en el lector de placas y se calculó la relación ATP/ADP con la siguiente fórmula: $RLU_A / (RLU_C - RLU_B)$. Todas las medidas de este ensayo se realizaron en el lector Víctor X3 (PerkinElmer).

4.1.4. Ensayo de sensibilidad a rotenona

Se sembraron 5×10^3 células por pocillo en placas de 96 pocillos en medio sin glucosa y en medio sin glutamina con 100 mg/L de glucosa. Se incubaron las células en normoxia y 5% de hipoxia durante 12 horas. A continuación, se trataron las células con concentraciones crecientes de rotenona (Sigma) en un rango de 0-300 µM. Posteriormente, se incubaron las células en normoxia y 5% de hipoxia durante 24 horas. Finalmente, se midió la viabilidad celular con el ensayo de MTS (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.1.5. Recogida de células en condiciones limitantes de nutrientes

Se sembraron 1×10^6 células en placas de 10 cm en medio sin glucosa o en medio sin glutamina con 100 mg/L de glucosa y se cambió el medio diariamente hasta que las células alcanzaron una confluencia del 80%, momento en el que se recogieron las células para su posterior extracción de ARN o proteínas (apartados 6.1 y 7.2 respectivamente).

4.1.6. Cuantificación de ROS mitocondrial

Se sembraron $1,5 \times 10^5$ células en placas de 6 pocillos en medio completo, medio sin glutamina con 100 mg/L de glucosa y medio con glutamina y sin glucosa. Se

incubaron las células en normoxia durante 16-18 horas y se cambió el medio 30 minutos antes de comenzar la tinción con MitoSox Red (Invitrogen). Para ello, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS, se añadió 1 ml de MitoSox Red 5 μ M, diluido en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), y se incubaron las células durante 15 minutos a 37°C en oscuridad. A continuación, se tripsinizaron las células y se lavaron dos veces con HBSS. Finalmente, se resuspendieron las células en 500 μ l de PBS con 2% FBS y EDTA 5 mM y se examinó la suspensión celular en el citómetro analítico Canto II (BD Biosciences).

4.2. Ensayos de tumorigénesis

Todos los ensayos de este apartado, a excepción del ensayo de formación de tumoresferas, se han realizado en dos condiciones diferentes de glucosa: medio con 4500 mg/L de glucosa (Sigma) y medio con 100 mg/L de glucosa (Gibco).

4.2.1. Ensayo de proliferación

Se sembraron 1×10^4 células en pocillos de 35mm por triplicado. A las 24 horas (día 0) se fijaron las células del primer punto y cada 24 o 48 horas, dependiendo de la línea celular, se fijó un punto de la curva. El medio de las placas que permanecían en cultivo se cambió cada 3 días en el caso de las placas de glucosa alta y cada 2 días en las de glucosa baja. Las células se fijaron con glutaraldehído 0,5% y se tiñeron con cristal violeta 1%. Después de lavar y dejar secar las placas, el cristal violeta se disolvió en ácido acético 15% y se cuantificó el número relativo de células midiendo la absorbancia del cristal violeta a 595 nm. Los valores se representaron refiriéndolos al día 0.

4.2.2. Clonabilidad

Las células fueron sembradas a baja densidad, 100 ó 1000 células en función de la línea celular, en placas de 10 cm por triplicado y cultivadas en condiciones estándar. El medio se cambió dos veces por semana y después de 10-15 días, se fijaron y tiñeron con cristal violeta. Después de lavar, se cuantificó el número de colonias.

4.2.3. Crecimiento en agar blando

Para medir el crecimiento independiente de anclaje se resuspendieron 1×10^5 células en agarosa D-1 low EEO (iNtRON Biotechnology) 1,4% con medio de cultivo, por triplicado. Este medio con las células se echó encima de una base de medio con agar 2,8% previamente solidificado en pocillos de 35mm. Tras 24 horas, se añadieron

3ml de medio a cada pocillo, que se cambió dos veces por semana. Tras un mes, se tomaron fotos con un microscopio invertido (Olympus IX-71), se tiñó con cristal violeta 0,05% y se contó el número de colonias.

4.2.4. Ensayo de migración

Las células se sembraron en pocillos de 35mm por triplicado y se cultivaron hasta alcanzar una monocapa. En ese momento, se generó una herida usando una punta de pipeta de 20µl. Se tomaron fotografías cada 4-6 horas, en función de la línea celular, hasta que se cerrase la herida por migración celular. Para obtener las fotografías se utilizó un microscopio invertido (Olympus IX-71). Finalmente, se cuantificó el área de la herida sin cerrar a diferentes tiempos.

4.2.5. Análisis y clasificación de clones

Las células fueron sembradas a baja densidad, 100 ó 1000 células en función de la línea celular, en placas de 10 cm por triplicado y cultivadas en condiciones estándar. El medio se cambió dos veces a la semana y después de 10-15 días, una vez formados los clones, se observó la morfología de cada clon en un microscopio invertido (Olympus CKX41). Finalmente se hizo un recuento de cada tipo de clon en base a la siguiente clasificación: holoclón, constituido por células con propiedades de célula madre, paraclón, formado por células diferenciadas que no son capaces de reconstituir un cultivo y meroclón, compuesto por células con características intermedias entre holoclones y paraclones⁸¹⁻⁸⁶.

4.2.6. Ensayo de formación de tumoresferas

Se sembraron 3×10^3 células de la línea celular ACHN, y 5×10^3 células de las líneas A498, 786-O y CaKi-1, por triplicado en placas de baja adherencia. Las células se resuspendieron en 1 ml de medio MammoCult completo (Stem cell technologies), compuesto por medio basal MammoCult, suplemento de proliferación MammoCult, 4µg/ml de heparina, 0,48µg/ml de hidrocortisona, 40 µg/ml de penicilina, 40 µg/ml de estreptomicina y 1 µg/ml de fungizona. Las células se cultivaron durante 4 días, momento en el que se tomaron fotos de las esferas formadas en un microscopio invertido (Olympus IX-71) y se cuantificó el número total de esferas.

4.2.7. Ensayo de formación de tumoresferas a partir de una célula aislada

La suspensión de $1-2 \times 10^6$ células, previamente tripsinizada, se resupendió en 1 ml de PBS con 2% FBS y EDTA 5 mM. A continuación, se separó la suspensión célula a célula con el citómetro de flujo BD FACSJazz (BD Biosciences). Cada célula se

sembró individualmente en un pocillo de baja adherencia de 6,4 mm de diámetro que contenía 100 µl de medio. Se sembraron 240 pocillos con medio MammoCult completo y 240 pocillos con medio de baja glucosa, compuesto por medio basal MammoCult mezclado con RPMI o DMEM sin glucosa en una relación 1:1, suplemento de proliferación MammoCult, 4µg/ml de heparina, 0,48µg/ml de hidrocortisona, 40 µg/ml de penicilina, 40 µg/ml de estreptomycin y 1 µg/ml de fungizona. Tras 21 días, se observaron las células al microscopio, se cuantificó el número de células que habían formado una esfera, el tamaño de las esferas y se tomaron fotos en un microscopio invertido (Olympus IX-71).

4.2.8. Análisis de marcadores por citometría de flujo

La suspensión previamente tripsinizada de 1×10^6 células se resuspendió en 125 µl de PBS con 2% FBS y EDTA 5 mM. Después se bloqueó dicha suspensión añadiendo 12,5 µl de agente de bloqueo (Miltenyi Biotec) y se incubó durante 10 minutos en hielo. A continuación se añadió el anticuerpo contra CD34 conjugado con el fluorocromo FITC (Miltenyi Biotec) a una dilución 1:25 y se incubó durante 30 minutos en hielo y oscuridad. Se dejó un tubo con 1×10^6 células sin marcar con el anticuerpo para usarlo como control negativo de la tinción. Una vez finalizado el periodo de incubación, se lavaron las células 2 veces con PBS con 2% FBS y EDTA 5 mM. Posteriormente, se centrifugaron las células durante 5 minutos a una velocidad de 1000G y se resuspendieron en 500 µl de PBS con 2% FBS y EDTA 5 mM. Finalmente, se examinó la suspensión celular en el citómetro analítico Canto II (BD Biosciences).

5. Ensayos *in vivo*

5.1. Generación de *xenografts*

Para generar los *xenografts*, se inoculó 1 millón de células en el caso de las líneas A498, ACHN y CaKi-1, ó 5 millones en el caso de la línea 786-O, en ratones atímicos de la especie *Nude-Foxn1*. Se utilizaron 5 hembras de 6-8 semanas de edad por condición. Los ratones fueron anestesiados con 100 µl de los agentes anestésicos diazepam/ketamina en una proporción 1:2 administrados por inyección intraperitoneal. A continuación, se tripsinizaron las células y se resuspendieron en un volumen adecuado de medio, 50µl por ratón cuando se inoculó 1 millón de células o 75 µl cuando se inocularon 5 millones. Una vez resuspendidas en medio de cultivo, se mezclaron con matrigel (Corning) en una relación 1:1, de forma que el volumen final de la mezcla células-matrigel que se inoculó a cada ratón fue de 100-150µl, y se inyectaron en el flanco derecho de la pata trasera por inyección subcutánea. Por

último, se marcaron las orejas de los ratones y se colocaron en una placa térmica a 37°C durante 30-60 minutos, hasta que se recuperaron del procedimiento.

Una semana después de inocular las células en los ratones, se comenzó a observar la aparición de tumor en el flanco derecho. Cuando el tumor formado alcanzaba un tamaño de 25 mm³, se comenzaba a medir el tumor una vez a la semana con un escalímetro digital hasta que alcanzara un tamaño aproximado de 300 mm³, momento en el que se procedía al sacrificio del animal. Si los ratones presentaban signos de aparición de metástasis antes de que creciera el tumor, se sacrificaban en ese momento.

Todos los ratones fueron mantenidos de acuerdo a las normas establecidas en el animalario del IBiS (basadas en lo estipulado en el Real Decreto 53/2013) y se sacrificaron mediante inhalación de CO₂ cuando se detectó cualquier signo importante de enfermedad, con el fin de evitar el sufrimiento del animal. El comité ético del Hospital Universitario Virgen del Rocío/IBiS aprobó los procedimientos (Código: 0309-N-15).

5.2. Necropsias

Una vez sacrificados los animales, se realizó la necropsia completa (a excepción del cerebro) y se recogieron muestras del tumor y de los tejidos afectados para realizar el análisis histológico y molecular si fuera necesario. Las muestras tumorales fueron divididas en 3 partes, una para histología, otra para análisis de ARN y proteínas, y la última para futuros reimplantes. Las muestras para histología se fijaron en formol al 4% durante 24 horas. Tras un proceso de deshidratación con etanol a distintas concentraciones y xilol, se introdujeron en bloques de parafina a 65°C. Por otra parte, el trozo procedente del tumor destinado para análisis de proteína y ARN se dividió a su vez en 2 partes, las cuales se congelaron en criotubos y se mantuvieron a -80°C. Finalmente, el último tercio del tumor se dividió en pequeñas piezas de 2-3 mm de diámetro y se congelaron en FBS con 10% de DMSO, manteniéndose a -80°C para futuros reimplantes.

6. Técnicas de análisis de expresión a nivel de ARN

6.1. Extracción de ARN total

El ARN total de líneas celulares se purificó con el kit de Promega ReliaPrep™ según las indicaciones del fabricante para 5x10⁵-2x10⁶ células. A las células en monocapa, lavadas con PBS, se les añadió 1 ml de PBS y utilizando un rascador se extrajo el lisado celular, se echó en un tubo de 1,5 ml y se centrifugó la muestra

durante 5 minutos a 1000 rpm. A continuación se descartó el sobrenadante y se homogeneizó el pellet con la solución BL+TG (que contiene 1-tioglicerol) para lisar las células. Acto seguido se añadió isopropanol y se mezcló la solución con un vórtex. Posteriormente se transfirió el lisado celular a una minicolumna colocada en un tubo de 1,5 ml y se centrifugó durante 30 segundos a 14.000 rpm. Se descartó el líquido del tubo, se añadió la solución de lavado de ARN a la columna y se centrifugó de nuevo durante 30 segundos a 14.000 rpm. A continuación se vació el tubo colector y se realizó un tratamiento con ADNasa I durante 15 minutos a 25°C. Una vez finalizado el tratamiento, se añadió la solución de lavado de la comuna, se centrifugó durante 15 segundos a 14.000 rpm. y se eliminó el líquido del tubo colector. A continuación se realizaron dos lavados de la columna con la solución de lavado de ARN mediante centrifugaciones de 30 segundos y 2 minutos a 14.000 rpm. Finalmente, se eliminó el tubo colector, se colocó la minicolumna en un tubo de 1,5 ml limpio, se añadió agua libre de nucleasas a la columna y se centrifugó durante 1 minuto a 14.000 rpm para eluir el ARN. La concentración de ARN fue cuantificada en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific).

6.2. Transcripción reversa

La transcripción reversa se realizó con el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (ThermoFisher Scientific). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se mezclaron, en hielo, 2 µl de tampón de retrotranscripción 10X, 0,8 µl de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) 25X, 2 µl de cebadores de secuencia aleatoria (*random primers*) 10X, 1 µl de transcriptasa reversa y 4,2 µl de agua libre de nucleasas. Esta mezcla de 10 µl de volumen total se adicionó a un tubo de PCR que contenía 10 µl con 3 µg de ARN total diluidos en agua libre de nucleasas para completar el volumen de la reacción. Se mezcló el volumen de reacción en un vórtex durante unos segundos y se centrifugó brevemente. A continuación se introdujo el tubo de PCR en un termociclador para llevar a cabo la reacción de transcripción reversa. La reacción consta de los siguientes pasos: 10 minutos a 25°C, 37 minutos a 120°C y 5 minutos a 85°C. Una vez finalizada la reacción se guardó el ADN complementario (ADNc) a -20°C hasta su uso.

6.3. PCR cuantitativa a tiempo real

La detección de cambios en la expresión génica se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real con ADNc procedente de la retrotranscripción reversa como material genético de partida (RT-qPCR). Para llevar a cabo la PCR cuantitativa a tiempo real se añadieron las siguientes cantidades por pocillo en placas de 384

pocillos (Applied biosystem): 2 µL de ADNc (dilución 1/10 del producto de la reacción de transcriptasa reversa), 5 µL de mezcla para qPCR GoTaq® (Promega) 2X y 0,5 µL de ensayo TaqMan 20X (Applied biosystem), que contiene los cebadores y la sonda para el ARNm de interés. Las distintas sondas TaqMan utilizadas en esta tesis se describen en la tabla 3. La qPCR se realizó en el termociclador ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). El programa de PCR consistió en 10 minutos a 95°C seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

El análisis de los cambios relativos en la expresión génica se realizó con el método comparativo de ciclo umbral ($\Delta\Delta C_t$) y con el programa RQ manager (Applied Biosystem). Para normalizar las muestras se usó β -actina como control endógeno. Cada reacción se hizo por triplicado y se realizaron al menos 3 experimentos independientes para cada gen analizado. Se introdujo una muestra de control negativo (sin ADNc) en cada experimento.

Tabla 3. Sondas TaqMan

Gen	Sonda	Gen	Sonda
<i>ACTB</i>	Hs0160665_g1	<i>VIM</i>	Hs00185584m1
<i>MYBBP1A</i>	Hs00959671_m1	<i>SNAI1</i>	Hs00195591_m1
<i>MYB</i>	Hs00920556_m1	<i>CD34</i>	Hs00990732_m1
<i>VHL</i> _{isoforma1}	Hs01650959_m1	<i>CXCR4</i>	Hs00607978_s1
<i>VHL</i> _{isoformas1,2}	Hs04195301_s1	<i>PGC1α</i>	Hs01016719_m1
<i>AURKB</i>	Hs00945858_g1	<i>HK2</i>	Hs00606086_m1
<i>NANOG</i>	Hs04260366_g1	<i>PFKM</i>	Hs00175997_m1
<i>OCT4</i>	Hs00999632_g1	<i>GAPDH</i>	Hs03929097_g1
<i>SOX2</i>	Hs01053049_s1	<i>PGK1</i>	Hs00943178_g1
<i>KLF4</i>	Hs00358836_m1	<i>PGAM1</i>	Hs01652468_g1
<i>MYC</i>	Hs00153408_m1	<i>PKM</i>	Hs00761782_g1
<i>BMI1</i>	Hs00995536_m1	<i>SGLT1</i>	Hs01573790_m1
<i>TWIST1</i>	Hs01675818_s1	<i>GLUT4</i>	Hs00168966_m1
<i>FOXC2</i>	Hs00270951_s1		

Todas las sondas se adquirieron de la casa comercial Applied biosystem.

6.4. PCR array

Se analizó la diferencia en expresión génica en condiciones de alta concentración de glucosa (4500 mg/L) y baja concentración de glucosa (100 mg/L) de la línea celular 786-O transfectada con el plásmido que expresaba el shARN contra *MYBBP1A* con respecto a la línea 786-O transfectada con el vector control, el cual contiene una secuencia “*scramble*” que no altera la expresión de ningún gen del genoma. Para ello, se utilizó la tarjeta de PCR array de metabolismo de glucosa de QUIAGEN (PAHS-00E-1) y se siguieron los siguientes pasos:

6.4.1. Eliminación de ADN genómico y transcripción reversa

La síntesis de ADNc se realizó con el kit RT² First Strand de QUIAGEN. En primer lugar se eliminó la posible contaminación de ADN genómico presente en las muestras de ARN. Para ello, se mezcló en un tubo de PCR 1 µg de ARN, 2 µl de tampón GE y se completó con agua libre de ARNasa hasta alcanzar un volumen de 10 µl por cada muestra. Se incubaron las muestras durante 5 minutos a 42°C y acto seguido se colocaron en hielo durante 1 minuto. A continuación se preparó la mezcla para la reacción de transcripción reversa. Se utilizaron 4 µl de tampón BC3 5X, 1 µl de control P2, 2 µl de la enzima transcriptasa reversa RE3 y 3 µl de agua libre de ARNasa, completando un volumen total de 10 µl por reacción. Se añadieron estos 10 µl a las muestras de ARN preparadas en el paso anterior, se mezcló bien cada muestra y se introdujeron las muestras en el termociclador para llevar a cabo la reacción de transcripción reversa. El programa de PCR consistió en 15 minutos a 42°C seguidos de 5 minutos a 95°C para parar la reacción. A continuación se colocaron las muestras en hielo, se añadieron 91 µl de agua libre de ARNasa a cada muestra y se dejaron en hielo hasta que se realizó la PCR cuantitativa a tiempo real. (Si esta PCR iba a realizarse otro día se guardaban las muestras a -20°C).

6.4.2. PCR cuantitativa a tiempo real

Las tarjetas de PCR array utilizadas consistían en placas de 384 pocillos para 4 muestras distintas. Para preparar las muestras para la PCR cuantitativa a tiempo real, se mezclaron en tubos de 1,5 ml 650 µl de RT² SYBR Green (QUIAGEN), 102 µl de ADNc sintetizado en el paso anterior y 548 µl de agua libre de ARNasa por cada muestra. A continuación, se cargaron 10 µl por pocillo de cada muestra siguiendo el protocolo de carga indicado por el fabricante. Finalmente, se introdujo la placa en el termociclador ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems) seleccionado el modo

“Cuantificación Absoluta”. El programa de PCR consistió en 10 minutos a 95°C seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

6.4.3. Análisis de los resultados

Se calculó el ciclo umbral de cada pocillo (Ct) con el programa RQ manager (Applied biosystem). A continuación, se exportaron estos datos y se introdujeron en la plantilla de Excel RT² PCR array proporcionada por SABiosciences. Una vez ordenados los datos en esta plantilla, se introdujeron en la plataforma online de SABiosciences para el análisis de datos de RT² PCR array. Se comprobó que los controles positivos y negativos del array eran correctos antes de realizar el análisis. También se verificó la adecuación de los cuatro controles endógenos presentes en el array (*HPRT1*, *RPL13A*, *GAPDH* y *ACTB*). Finalmente se analizaron los genes expresados diferencialmente utilizando como punto de corte una diferencia de expresión de 2 (aumento o disminución).

6.5. Hibridación de matrices de ARN

Las membranas con matrices de muestras de ARNm pareadas de tejido normal y tumoral (BD Biosciences) se pre-hibridaron con la solución de hibridación ExpressHyb durante 4 horas a 65°C. Las sondas para MYBBP1A y ubiquitina (Tabla 2) se marcaron por PCR con el residuo dCTP32 (Amersham). A continuación, las sondas marcadas se purificaron con una columna de sefrosa G-50 NickTM (Amersham). Las sondas purificadas se desnaturalizaron durante 3 minutos a 100°C y se añadieron a la solución de hibridación. La hibridación se realizó durante toda la noche a 65°C. A continuación, se lavaron las membranas dos veces a 65°C con 2xSSPE, 0,1% SDS, una vez con 1xSSPE, 0,1% de SDS y una última vez con 0,1xSSPE, 0,1% SDS. Finalmente, las membranas se revelaron con películas Biomax MS (Kodak).

Tabla 4. Sondas utilizadas en las matrices de ARN

Gen	Tamaño (pb)	Localización	Secuencia
<i>MYBBP1A</i>	218	963-1181 CDS	GCCAGCTACCTGTGTTTCCGCCTGCTGG GCGCGCCCTGCCCCTGCTGACCAAGGAG CAGCTGCACCGGTGATGCAGGGAGACGT GATCCGCCATTACGGGGAGCACGTGTGC ACTGCTAAGCTCCCAAAGCAGTTCAAGTT TGCCCCAGAGATGGACGATTACGTGGGC ACCTTCCTAGAGGGGTGCCAGGATGACC CTGAGCGGCAGCTGGCCGTGC
<i>UBC</i>	2058		cDNA completo

7. Técnicas de análisis de expresión a nivel de proteínas

7.1. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en esta tesis, así como su procedencia, especie, tipo (monoclonal o policlonal), aplicaciones y diluciones empleadas se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en esta tesis

Anticuerpo	Proveedor		Dilución		
			WB	IP	IF
MYBBP1A (policlonal conejo)	Proteintech	14524-AP	1:2500	1:1000	1:100
MYBBP1A (policlonal ratón)	Abcam	ab89121			1:50
MYB (monoclonal ratón)	Millipore	05-175	1:1000		
c-MYB (policlonal conejo)	Abcam	ab117635			1:100
VHL (policlonal conejo)	Santa cruz	sc-5575	1:400		1:50
UBTF (policlonal conejo)	Novus biologicals	NBP1-82545			1:50
p53 FL393 (policlonal conejo)	Santa cruz	sc-6243	1:1000		1:50
Acetil-p53(Lys382) (policlonal conejo)	Cell signalling	2525	1:1000		
PGC1α (policlonal conejo)	Abcam	ab54481	1:1000		
LKB1 (monoclonal conejo)	Cell signalling	27D10	1:1000		
AMPK α1+ AMPKα2 (monoclonal ratón)	Abcam	ab80039	1:1000		
p-AMPK α1 (T183)+ p-AMPKα2 (T172) (policlonal conejo)	Abcam	ab72845	1:1000		
SGLT1 (policlonal conejo)	Abcam	ab14685	1:1000		
mTOR (monoclonal conejo)	Cell signalling	2983	1:1000		
p-mTOR (Ser2448) (monoclonal conejo)	Cell signalling	5536	1:1000		
S6 proteína ribosomal (monoclonal conejo)	Cell signalling	2217	1:1000		
p-S6 proteína ribosomal (S235/236) (monoclonal conejo)	Cell signalling	4858	1:2000		
p38 MAPK	Cell signalling	9212	1:1000		
p-p38 MAPK (T180/Y182)	Cell signalling	9215	1:1000		
LC3B	Abcam	ab48394	1:1000		
p62	Abcam	ab109012	1:20000		
α- Tubulina	Sigma Aldrich	T9026	1:10000		
Conejo anti-ratón HRP (policlonal)	Abcam	ab97046	1:5000		
Cabra anti-conejo HRP (policlonal)	Abcam	ab97051	1:5000		
Cabra anti-ratón Alexa Fluor 546 (policlonal)	ThermoFisher	A21123			1:250
Cabra anti-conejo Alexa Fluor 488 (policlonal)	ThermoFisher	A11008			1:250

WB: western blot; IP: inmunoprecipitación; IF: inmunofluorescencia.

7.2. Extracción de proteína total

Las células se lavaron con PBS y se añadió sobre ellas un volumen apropiado de tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, NP-40 1%, desoxicolato de sodio 1%, SDS 1%, Na_3VO_4 1mM, EDTA 0,5M pH 8,0, cóctel de inhibidores de fosfatasas (Sigma) y cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma)). Se mantuvieron 10 minutos en hielo, en agitación, y se recogieron los lisados en tubos de 1,5 ml. A continuación, se sonicaron las muestras durante 3 ciclos de 10 segundos al 40% de potencia. Posteriormente, los restos de debris celular se eliminaron por centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante (extracto proteico) se guardó en alícuotas a -20°C.

7.3. Western blot

La inmunodetección de proteínas se realizó de acuerdo a un protocolo estándar. En primer lugar, se determinó la cantidad de proteína mediante el ensayo de Bradford (Biorad), se disolvieron 30µg de muestra en tampón de carga (Tris-HCl 62.5 mM pH 6,8, glicerol 10%, SDS 1%, 2-mercaptoethanol 5%, azul de bromofenol 0.0025% (Sigma)) y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida 8-12% (concentración dependiente del tamaño de la proteínas a detectar) en presencia de SDS, utilizando el sistema Mini-Protean Tetra Cell (Biorad). El tampón de electroforesis utilizado contenía Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1, pH 8,3). A continuación, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham Protran 0,2 µm), utilizando el equipo Mini Trans-Blot Cell (BioRad). La transferencia se realizó a 400 mA durante 2h en tampón de transferencia (TrisHCl 25 mM, glicina 192 mM, 20% metanol, pH 8,3). Las membranas se bloquearon durante 2h en agitación. El tampón de bloqueo contenía PBS, 0.1% Tween20 y 3% de BSA. Posteriormente, se incubaron toda la noche con la dilución adecuada de anticuerpo primario en tampón de bloqueo y agitación. Al día siguiente, se retiró el exceso de anticuerpo mediante 3 lavados de 10 minutos con PBS-Tween 20 0,1% en agitación. Finalmente, se incubaron las membranas durante una hora con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa diluido en PBS-Tween 20 0,1% y se retiró el exceso de anticuerpo mediante 3 lavados con PBS-Tween 20 0,1% en agitación. La detección se realizó mediante una reacción quimioluminiscente (ECL, Amersham) y la visualización con los equipos Chemidoc o Chemidoc Touch (Biorad).

7.4. Cuantificación de bandas de western blot

Para cuantificar las bandas de proteínas se usó el programa Image lab 5.1 de Biorad. Se seleccionó cada banda de forma individual, se restó el fondo inespecífico a cada banda cuantificada y siempre se refirió el valor a un control de carga de la misma membrana, α -tubulina.

7.5. Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación de proteínas se realizó de acuerdo a un protocolo estándar. En primer lugar, se cuantificó la cantidad de proteína de cada extracto mediante el ensayo de Bradford (Biorad). A continuación, se añadieron 50 μ l de bolas magnéticas (Cell signaling) en tubos de silicona de 1,5 ml para cada muestra. Se lavaron 2 veces con PBS-BSA (5mg/ml de BSA) con inhibidores de proteasa y fosfatasa (Sigma). Posteriormente, se añadió el anticuerpo diluido en PBS-BSA (dilución según anticuerpo en volumen final de 1 ml) a las bolas magnéticas y se incubaron durante 3 horas a 4°C en agitación. A continuación, se llevaron a cabo 2 lavados con PBS-BSA y se añadió 0,5 mg de proteína total, en volumen final de 500 μ l, a las bolas unidas con el anticuerpo. Se incubaron durante toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente, se separó mediante un imán la matriz formada por la unión bolas-anticuerpo del extracto que contiene las proteínas que no se han unido a la matriz, conservando este extracto (sobrenadante). Se continuó el proceso con la matriz con 2 lavados con PBS. Posteriormente, se realizaron 4 lavados con Igepal 0,2%. Las proteínas unidas a la matriz se eluyeron en 25 μ l de tampón de carga 2X (SDS 4%, 2-mercaptoetanol 10%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,004%, Tris-HCl 0,125M pH6, 8) incubando las muestras 10 minutos a 70 °C. Finalmente, se realizó un western blot con las muestras eluidas y las muestras del extracto proteico que no se había unido a la matriz.

7.6. Inmunofluorescencia

Se sembraron 3×10^5 células en placas de 6 pocillos, donde se habían introducido previamente dos cubreobjetos circulares estériles de 1 cm por pocillo, en medio de cultivo con 1000 mg/L de glucosa o 100 mg/L de glucosa. Al día siguiente se lavaron las células con PBS, se fijaron con una solución de paraformaldehído en PBS al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con tritón X-100 0,5% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavó 2 veces con PBS y se incubaron las muestras en solución de bloqueo (PBS, tritón X-100 0,1%, BSA 3%) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, se incubó con el

anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo (dilución según anticuerpo) durante 6-7 horas a 4°C en agitación. Para estudios de co-localización de dos proteínas, después de la incubación con el primer anticuerpo primario, se realizaron 4 lavados de 5 minutos con PBS-Tritón 0,1%. Acto seguido, se incubó, en las mismas condiciones, con el segundo anticuerpo primario, que debía estar generado en una especie diferente al primer anticuerpo primario. A continuación, se realizaron 4 lavados de 5 minutos con PBS-Tritón 0,1% y se añadió el primer anticuerpo secundario Alexa 546 o 488 diluido en solución de bloqueo (1: 250) durante 2 horas a temperatura ambiente, en oscuridad. Posteriormente, tras lavar 4 veces durante 5 minutos con PBS-Tritón 0,1%, se añadió el segundo anticuerpo secundario, que debía estar marcado con un fluoróforo diferente al del primer anticuerpo secundario y se incubó en las mismas condiciones. Tras 4 lavados con PBS-Tritón 0,1% durante 5 minutos y un lavado con PBS de 5 minutos, los núcleos fueron teñidos con DAPI diluido en PBS (dilución 1:1000) durante 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, tras lavar con PBS, se montaron los cristales con solución ProLong Gold (Invitrogen). Las imágenes se obtuvieron con el microscopio confocal Leica TCS-SP2-AOBS y se analizaron con el software LCS Lite.

8. Análisis de muestras de pacientes

8.1. Cohorte de pacientes

La cohorte de 97 pacientes, compuesta por muestras de micromatrices de tejido (TMAs) de carcinoma renal y sus correspondientes datos clínicos, se obtuvo del Biobanco del Hospital Universitario Virgen del Rocío-Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). El comité ético del Hospital Universitario Virgen del Rocío/IBiS aprobó los procedimientos (Código: 0309-N-15).

8.2. Inmunohistoquímica

Se cortaron láminas de tres micrómetros de grosor del bloque de TMA y se colocaron en portaobjetos con tratamiento específico para inmunohistoquímica (DAKO, Glostrup). Los portaobjetos se hornearon durante toda la noche a 56°C, se desparafinaron en xileno durante 20 min, se rehidrataron en una serie graduada de etanol y se lavaron con PBS. A continuación, se llevó a cabo un paso de recuperación de epítipo inducida por calor. Para ello, se calentó el portaobjetos en una solución de tampón de citrato de sodio a pH 6,5 durante 2 min en una olla a presión convencional. Posteriormente, se incubaron los portaobjetos con proteinasa K durante 10 min y se aclararon en agua corriente fría durante 5 min. A continuación, se inactivó

la actividad peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno 1,5% diluido en metanol (DAKO) durante 10 minutos. Acto seguido, se incubaron los portaobjetos con el anticuerpo primario anti-MYBBP1A (Proteintech #14524-AP) durante 40 min. Tras esta incubación, se realizó la inmunodetección con el sistema de visualización EnVision (DAKO, Glostrup) usando diaminobenzidina como sustrato, siguiendo las instrucciones del fabricante. La inmunotinción se realizó en un dispositivo de inmunotinción automática TechMate 500 (DAKO). La valoración de las muestras fue realizada por patólogos mediante análisis microscópico semicuantitativo de doble ciego. Se asignaron valores discretos entre 0 (expresión de MYBBP1A nula) y 3 (expresión más alta) en función de la intensidad de la señal. Por último, se hizo la media de las distintas valoraciones de cada muestra.

8.3. Análisis estadístico

Las muestras se clasificaron en dos grupos en función de los niveles de expresión de MYBBP1A, definiéndose los grupos MYBBP1A bajo ($\text{MYBBP1A} \leq 1$) y MYBBP1A normal ($\text{MYBBP1A} > 1$). Para establecer el punto de corte de esta clasificación se utilizó el programa de cálculos estadísticos SPSS 21.0. Posteriormente, se analizaron las variables tipo de tumor, estadio, grado histológico y metástasis en función de los niveles de MYBBP1A con el programa de análisis estadístico Graph Pad Prism 6, aplicándose el test estadístico *T-student*. Para los análisis de supervivencia se utilizó el programa SPSS 21.0. Se realizaron curvas Kaplan-Meier y se aplicó el test estadístico log-rank para comparar la distribución de la supervivencia entre los grupos MYBBP1A bajo y MYBBP1A normal. Se definió la supervivencia libre de enfermedad (SLE) como el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la fecha de la primera recidiva o evento de progresión y la supervivencia global (SG) como el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la última fecha de seguimiento. Para la supervivencia global se usó como criterio de punto final la muerte causada por la enfermedad.

9. Análisis de bases de datos públicas

9.1. Bases de datos

En esta tesis se han utilizado las siguientes bases de datos:

cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>): análisis de mutaciones en tumores humanos^{87,88}.

MapLab, aplicación Wanderer (<http://maplab.imppc.org/>): análisis de niveles de metilación en tumores humanos⁸⁹.

NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>): secuencias de nucleótidos.

GeneCards (<http://www.genecards.org/>): genes humanos.

JASPAR (http://jaspar.binf.ku.dk/cgi-bin/jaspar_db.pl): análisis de sitios de unión de factores de transcripción.

9.2. Análisis en R2

El análisis bioinformático de datos de pacientes de cáncer renal procedentes de bases de datos transcriptómicas públicas se realizó con la plataforma de visualización y análisis genómico R2 (<http://hgserver1.amc.nl>), desarrollada por el Departamento de Oncogenómica del Centro Médico Académico (AMC) de Ámsterdam.

Se utilizaron seis bases de datos de cáncer renal en total. Para simplificar el análisis se agruparon las bases de datos disponibles en tres bases de datos:

- Dykema-KORT: unión de dos bases de datos de muestras renales normales y tumorales. Se unieron estas dos bases de datos porque las muestras normales eran las mismas en ambas bases de datos, de forma que se unieron las muestras tumorales únicamente. Ambas bases de datos fueron generadas con la plataforma de Affymetrix u133p2 y normalizadas con el método mas5.0.
- EXPO: base de datos de muestras tumorales, generada con la plataforma de Affymetrix u133p2 y normalizada con el método mas5.0.
- TCGA: base de datos compuesta por tres bases de datos de muestras tumorales normalizadas, una base de datos de carcinoma renal de células claras, una base de datos de carcinoma renal de células papilares y una base de datos de carcinoma renal de células cromóforas. Todas estas bases de datos fueron generadas con la plataforma tcgars y normalizadas con el método rsem.

El análisis de los niveles de expresión de *MYBBP1A* se realizó en primer lugar con las bases de datos Dykema-KORT y EXPO, ya que son comparables entre ellas por haber sido generadas con la misma plataforma y normalizadas con el mismo método. Se exportaron los valores de expresión de R2 al programa Graph Pad Prism 6, con el que se realizó el estudio estadístico con el test *T-student*. Se evaluaron los niveles de expresión de *MYBBP1A* en función del tipo de tumor y del estadio tumoral. Por otra parte se analizó la expresión de *MYBBP1A* en los distintos subtipos de tumores renales de la base de datos TCGA, comparando la expresión de *MYBBP1A* en tejido normal y tumoral.

Para identificar los genes cuya expresión correlacionaba positiva o negativamente con la expresión de *MYBBP1A*, se analizó la correlación entre *MYBBP1A* y los genes pertenecientes a los KEGG “Rutas de señalización que regulan la pluripotencia de las células madres”, “Glucólisis y gluconeogénesis” y “Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y ciclo del citrato” presentes en la plataforma R2. También se analizó la correlación entre la expresión de *MYBBP1A* y la expresión de los genes diana de c-MYB, en este caso se añadió la lista de genes diana de c-MYB definida en la base de datos “GeneCards” a la plataforma R2. Se examinaron estas correlaciones en las tres bases de datos y se seleccionaron únicamente aquellos genes que correlacionaban con *MYBBP1A* en al menos dos de las tres bases de datos analizadas con un p-valor inferior a 0,05. Además, se estudiaron correlaciones individuales entre la expresión de *MYBBP1A* y algunos genes relevantes en el estudio. Para ello, se exportaron los datos de expresión de R2 de cada una de las bases de datos analizadas a Graph Pad Prism 6, se representaron los niveles de expresión de *MYBBP1A* frente a cada uno de los genes seleccionados mediante gráficas de dispersión con regresión lineal y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson con el p-valor asociado.

Los diagramas de Venn se representaron con la herramienta online del grupo de Bioinformática y Genómica evolutiva de la Universidad de Gante (Bélgica) (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Las listas de genes obtenidas en la intersección del diagrama de Venn fueron clasificadas por KEGG y ordenadas por p-valor con la herramienta informática Enrichr (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>), desarrollada por el grupo de Biología de sistemas computacional de la escuela de medicina Icahn del Mount Sinai^{90,91}

Finalmente, los “*heatmaps*” de la expresión de *MYBBP1A* y las selecciones de genes del KEGG “Rutas de señalización que regulan la pluripotencia de las células madres” y de los genes diana de c-MYB se generaron por distancia ciudad-bloque. Los *heatmaps* de los genes pertenecientes a los KEGG “Glucólisis y gluconeogénesis” y “Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y ciclo del citrato” se generaron por distancia Euclídea.

10. Análisis estadístico

Utilizamos el programa informático GraphPad PRISM para todos los análisis estadísticos de los experimentos realizados con las líneas celulares y de los experimentos con *xenografts*. Para analizar las diferencias entre las líneas transfectadas con el shARN frente a *MYBBP1A* y las líneas transfectadas con el vector

control se utilizó el test estadístico *T-student* para muestras no pareadas o el test *T-student* con la corrección de Welch. Valores de p inferiores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos y se representaron según la siguiente clasificación:

$p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), y $p < 0,001$ (***)).

RESULTADOS

1. Pérdida de MYBBP1A en tumores humanos

El antisentido frente a *MYBBP1A* fue aislado en el rastreo genético en ausencia de glucosa (Figura 3), sugiriendo que la pérdida de MYBBP1A proporciona a las células una ventaja selectiva para crecer en condiciones limitantes de glucosa. Si la pérdida de MYBBP1A es relevante para la evolución de las células debería mantenerse en el crecimiento de tumores y ser identificada en muestras de tumores humanos. Con el fin de comprobar esta hipótesis, realizamos una búsqueda de mutaciones descritas en el gen *MYBBP1A* en tumores humanos en la base de datos cBioPortal. Encontramos numerosas mutaciones, la mayoría mutaciones con cambio de sentido y el resto deleciones con cambio de ORF o deleciones sin cambio de ORF (Figura 5, Tabla 6).

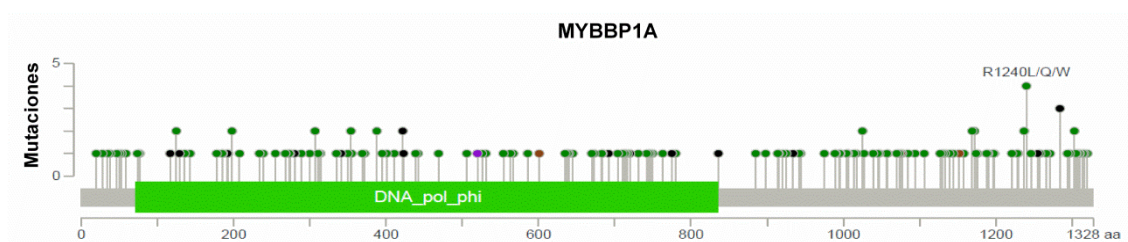


Figura 5. Mutaciones en el gen *MYBBP1A* descritas en tumores humanos. Imagen obtenida de la base de datos cBioPortal. Verde: mutaciones con cambio de sentido (229); marrón: mutaciones en el marco de lectura (3); negro: mutaciones truncadas (15); morado: otras (1).

Tabla 6. Ejemplos de mutaciones en el gen *MYBBP1A* descritas en tumores humanos

Muestra (ID)	Estudio	Cambio de AA	Tipo de mutación	Copia #
TCGA-BP-4763-01	CCRcc(TCGApub)	T1106M	C. sentido	Diploide
TCGA-A3-3363-01	CCRcc(TCGA)	P350L	C. sentido	Ganancia
TCGA-A4-8515-01	CCRp(TCGA)	H1005R	C. sentido	Ganancia
TCGA-B1-A47N-01	CCRp(TCGA)	R1027S	C. sentido	Ganancia
ACINAR05	PAAC (JHU)	N925S	C. sentido	ND
TCGA-OR-A5KB-01	ACC (TCGA)	L422F	C. sentido	Diploide
TCGA-OR-A5KB-01	ACC (TCGA)	V423Lfs*26	FS del	Diploide
TCGA-OR-A5KB-01	ACC (TCGA)	L422Ffs*2	FS del	Diploide
MSKCC-0741_R	Vejiga (DFCI/MSKCC 2014)	K717R	C. sentido	ND
MSKCC-0100_R	Vejiga (DFCI/MSKCC 2014)	E442Q	C. sentido	ND
TCGA-H4-A2HO-01	Vejiga (TCGA 2014)	G1057C	C. sentido	Diploide
TCGA-G2-A3VY-01	Vejiga (TCGA 2014)	N136S	C. sentido	HetDel
TCGA-H4-A2HO-01	Vejiga (TCGA)	G1057C	C. sentido	Diploide
TCGA-G2-A3VY-01	Vejiga (TCGA)	N136S	C. sentido	HetDel
TCGA-FG-5965-01	Glioma (TCGA)	P1006L	C. sentido	Diploide
TCGA-AN-A0FZ-01	Mama (TCGA 2015)	V763A	C. sentido	HetDel
TCGA-BH-A18L-01	Mama (TCGA 2015)	S1314N	C. sentido	HetDel

Muestra (ID)	Estudio	Cambio de AA	Tipo de mutación	Copia #
TCGA-AC-A23H-01	Mama (TCGA 2015)	E780K	C. sentido	Diploide
TCGA-B6-A0WS-01	Mama (TCGA pub)	K638E	C. sentido	HetDel
TCGA-BH-A18L-01	Mama (TCGA pub)	S1314N	C. sentido	HetDel
TCGA-E2-A1B4-01	Mama (TCGA pub)	X720_splice	Splice	Diploide
TCGA-AN-A0FZ-01	Mama (TCGA pub)	V763A	C. sentido	HetDel
TCGA-AN-A0FZ-01	Mama (TCGA)	V763A	C. sentido	HetDel
TCGA-AC-A23H-01	Mama (TCGA)	E780K	C. sentido	Diploide
TCGA-BH-A18L-01	Mama (TCGA)	S1314N	C. sentido	HetDel
SA531T-whole_genome	Mama (BCCRC Xenograft)	E59Q	C. sentido	HetDel
SA531X1-whole_genome	Mama (BCCRC Xenograft)	E59Q	C. sentido	HetDel
TCGA-DG-A2KL-01	Cérvix(TCGA)	M1139I	C. sentido	Diploide
TCGA-IR-A3LA-01	Cérvix (TCGA)	G234E	C. sentido	Diploide
TCGA-W5-AA2Q-01	Colangiocarcinoma (TCGA)	L74Q	C. sentido	Diploide
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	R1169Q	C. sentido	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	A1294T	C. sentido	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	R1240W	C. sentido	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	R1240W	C. sentido	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	R1025W	C. sentido	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	P1176S	C. sentido	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	S1045P	C. sentido	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	A1237T	C. sentido	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	A1237T	C. sentido	ND
coadread_dfci_2016_3399.	Colorrectal (DFCI 2016)	K1284Rfs*39	FS del	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	A311T	C. sentido	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	K1152del	IF del	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	A920T	C. sentido	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	R307C	C. sentido	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	V673M	C. sentido	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	R76H	C. sentido	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	L1070M	C. sentido	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	Y355C	C. sentido	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	R178W	C. sentido	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	A268V	C. sentido	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	N1255Tfs*7	FS del	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	R1240Q	C. sentido	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	A1320T	C. sentido	ND
coadread_dfci_2016_3399	Colorrectal (DFCI 2016)	E742G	C. sentido	ND

Datos obtenidos de la base de datos cBioPortal. C.sentido = cambio de sentido; FS del = delección con cambio de marco de lectura; IF del = delección en el marco de lectura; ND = dato no disponible; HetDel= delección heterocigota.

A continuación, analizamos los niveles de expresión de *MYBBP1A* en distintos tipos de tumores humanos en la base de datos *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) y observamos que la expresión de *MYBBP1A* disminuía especialmente en carcinomas renales de células claras (Figura 6A). A raíz de este resultado, estudiamos el patrón de metilación de *MYBBP1A* en muestras normales y muestras de carcinomas renales de células claras en la base de datos MapLab⁸⁹ (Figura 6B). Aunque no había diferencias en la media de los niveles de metilación entre las muestras tumorales y las normales (Figura 6B), observamos un pequeño porcentaje de muestras tumorales (2-4%) que presentaban altos niveles de metilación y bajos niveles de expresión de *MYBBP1A* (Figura 6C).

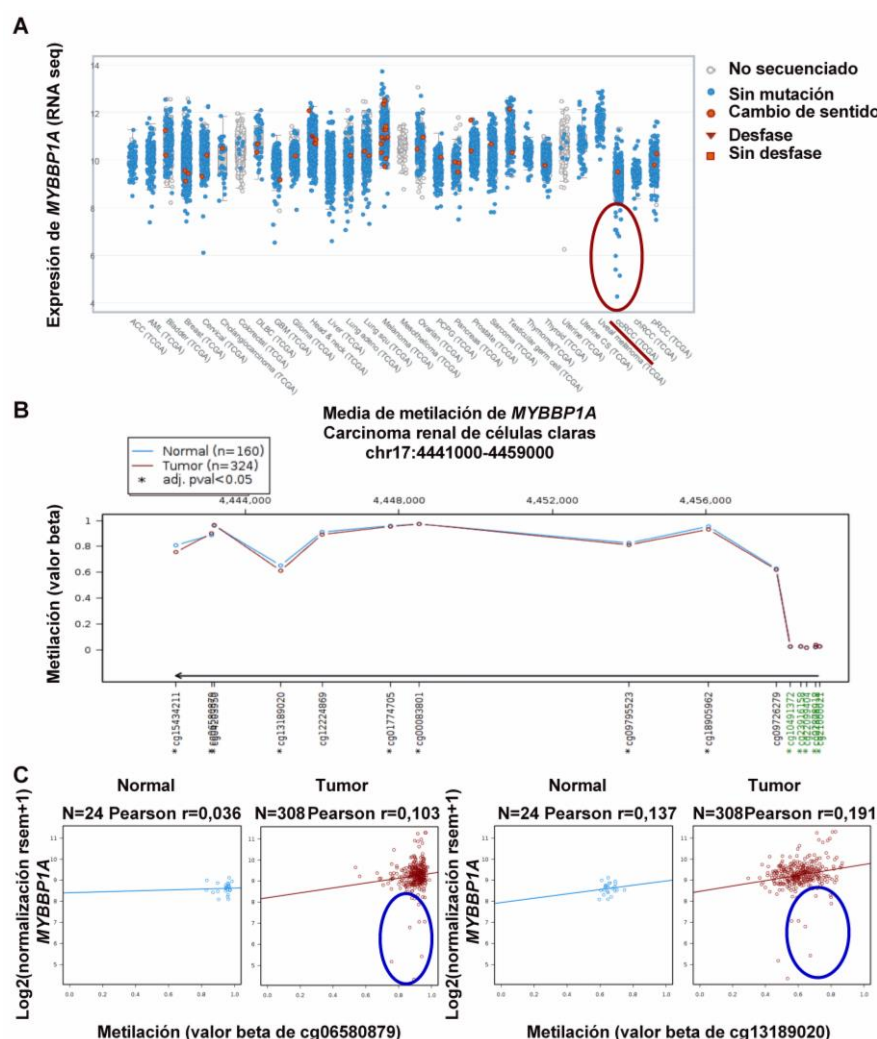


Figura 6. Análisis de los niveles de expresión y metilación de *MYBBP1A* en tumores humanos. (A) Niveles de expresión del gen *MYBBP1A* en tumores humanos. Datos obtenidos de la base de datos TCGA. **(B) Patrón de metilación del gen *MYBBP1A* en muestras normales y en carcinomas renales de células claras.** Se muestra el valor beta medio de distintas sondas utilizadas para medir los niveles de metilación de *MYBBP1A* en muestras normales y tumorales. El color verde indica las zonas con islas CpG. **(C) Análisis de la correlación entre los niveles de metilación y los niveles de expresión de *MYBBP1A*.** Representación gráfica del valor beta de dos sondas de metilación con respecto a la expresión de *MYBBP1A* en muestras normales y tumorales. Se analizó la correlación con el coeficiente de correlación de Pearson. Datos obtenidos de la herramienta *Wanderer* de la base de datos MapLab⁸⁹.

Finalmente, realizamos un estudio con matrices de muestras de ARNm de muestras pareadas de pacientes (tejido normal y tejido tumoral) (Figura 7). Se hibridaron las matrices con una sonda de ADNc de *MYBBP1A* marcada radioactivamente y como control se hibridó la misma matriz con una sonda para Ubiquitina. Observamos una reducción de al menos un 50% de la expresión de *MYBBP1A* en un porcentaje de casos de tejido tumoral en comparación con el tejido normal en tumores de riñón, hígado y páncreas principalmente (Figura 7).

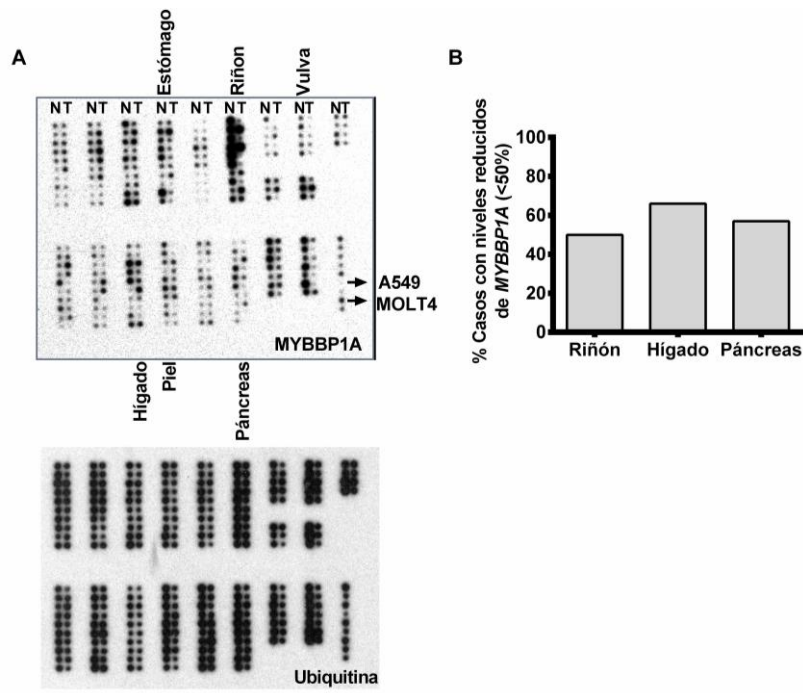


Figura 7. Disminución de la expresión de *MYBBP1A* en tumores de riñón, hígado y páncreas. (A) Estudio de los niveles de ARNm de *MYBBP1A* en matrices de ARN de tumores. Matrices de muestras pareadas no tumoral/tumoral (N/T) del mismo paciente hibridadas con una sonda de *MYBBP1A* marcada con P32 para determinar la cantidad relativa de ARNm de *MYBBP1A* (arriba) o ubiquitina (abajo). **(B) Cuantificación de los niveles de expresión de *MYBBP1A* en tumores de riñón, hígado y páncreas.** Se cuantificaron los niveles de ARNm de cada muestra y se normalizaron con el nivel de expresión de ubiquitina. El valor normalizado de cada muestra tumoral se comparó con el valor de su pareado normal. Los datos se representan gráficamente como porcentaje de casos.

En base a este resultado y al hecho de que la degradación de *MYBBP1A* está regulada por pVHL⁶⁹, que se pierde frecuentemente en tumores renales, decidimos centrarnos en los tumores renales y usar líneas celulares de carcinoma renal con el fin de obtener el modelo celular con lo que consideramos que eran las características más fisiológicas posibles para nuestro estudio.

Para evaluar en profundidad la pérdida de *MYBBP1A* en tumores renales, seleccionamos una cohorte de 97 pacientes de cáncer renal del Biobanco del Hospital Universitario Virgen del Rocío. Esta cohorte estaba compuesta de 4 casos de

muestras pareadas de tejido normal y tumoral y 93 casos de muestra tumoral (Tabla 7). En la clasificación de carcinomas renales establecida por la sociedad americana de cáncer (ACS) se distinguen los siguientes subtipos: carcinoma de células renales de células claras (el más frecuente), carcinoma de células renales papilar, carcinoma de células renales cromóforo y carcinoma de células renales poco comunes, entre los que se encuentran el carcinoma de células renales del túbulo colector y el carcinoma de células renales sarcomatoide. La cohorte de nuestro estudio presentaba una mayoría de tumores de carcinoma renal de células claras, aunque había representación del resto de subtipos. Todos los pacientes fueron tratados con cirugía y posteriormente la mitad de los pacientes recibieron quimioterapia y sólo un 10% radioterapia. La mayoría de los pacientes que recibieron quimioterapia fueron tratados con inhibidores de tirosina quinasa o inhibidores de mTOR y algunos pacientes recibieron varias líneas de tratamiento (Tabla 7).

Tabla 7. Resumen de las características de la población de estudio.

Características población	Número de casos	Porcentaje %
Tejido normal	4	4,12
Tipo de carcinoma de células renales (CCR)		
Células claras (CCRcc)	63	64,95
Papilar (CCRp)	22	22,68
Cromóforo (CCRcr)	2	2,06
Mixto	3	3,09
CCRcc sarcomatoide	5	5,15
CCRcr sarcomatoide	1	1,03
Inclasificable	1	1,03
Estadio		
I	41	42,27
II	10	10,31
III	23	23,71
IV	9	9,28
No determinado	14	14,43
Tratamiento		
Cirugía	97	100
Radioterapia	10	10,31
Quimioterapia	48	49,48
Inhibidores tirosina quinasa*	64	65,98
Inhibidores mTOR	24	24,74
Interleuquina 2	1	1,03
Capecitabina	1	1,03
Paliativo	5	5,15

*El porcentaje de pacientes tratados con inhibidores de tirosina quinasa es superior al porcentaje de quimioterapia porque algunos pacientes recibieron más de una línea de tratamiento.

Para valorar la expresión de MYBBP1A en tumores renales realizamos tinciones inmunohistoquímicas de las muestras de la cohorte de estudio con un anticuerpo contra MYBBP1A. Observamos que tanto la mayoría de las muestras tumorales como las muestras de tejido normal mostraban una tinción clara de MYBBP1A en el núcleo de las células, sin embargo, un pequeño número de casos (8,24%) presentaban una expresión reducida o nula de MYBBP1A (Figura 8A y 8B). Además, al comparar la expresión de MYBBP1A entre las muestras de tejido normal y tumoral de los 4 pacientes con muestras pareadas, observamos una pequeña disminución estadísticamente significativa de la expresión de MYBBP1A en el tejido tumoral (Figura 8C). También observamos que la pérdida de MYBBP1A no está asociada con un determinado subtipo de tumor (Figura 8D).

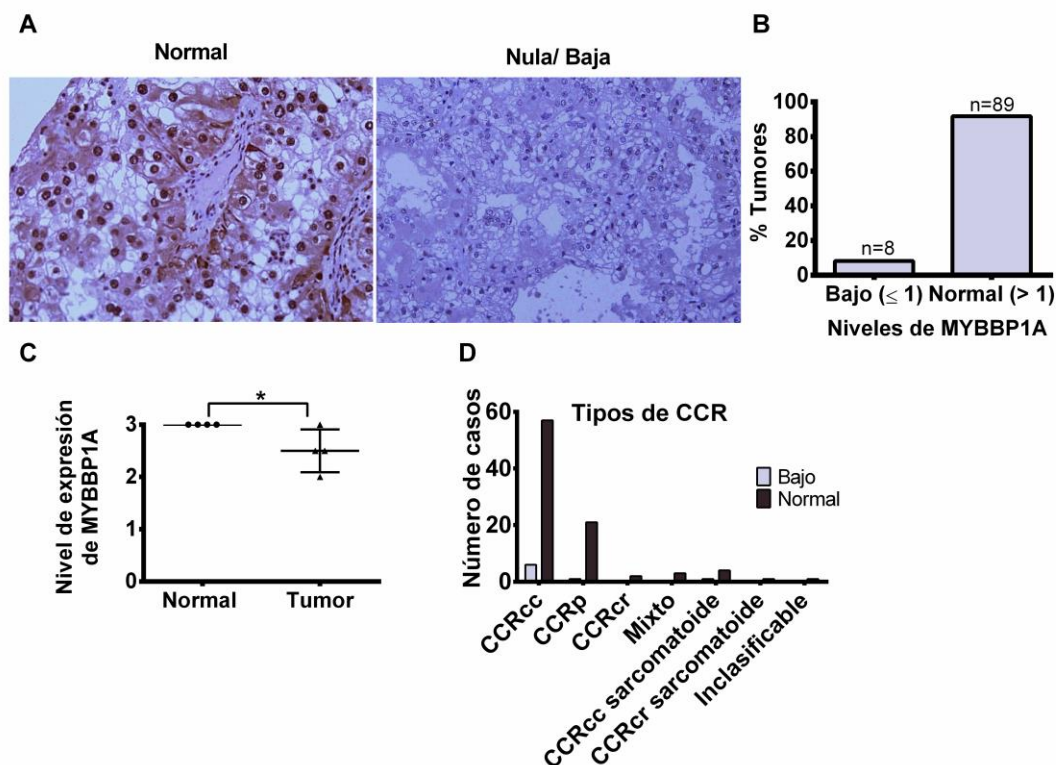


Figura 8. Pérdida de MYBBP1A en carcinomas de células renales. (A) Caracterización inmunohistoquímica de carcinomas de células renales. En la imagen de la izquierda se observa la tinción de una muestra tumoral con expresión normal de MYBBP1A y en la imagen de la derecha se muestra la tinción de una muestra tumoral con nula/baja expresión de MYBBP1A. **(B) Análisis cuantitativo de la pérdida de la expresión de MYBBP1A en carcinomas de células renales.** Representación de los porcentajes de carcinomas renales con nivel de expresión de MYBBP1A bajo y normal analizados por IHQ. Todas las muestras fueron valoradas según el siguiente criterio: niveles de expresión de MYBBP1A bajo ≤ 1 ; niveles de expresión de MYBBP1A normal > 1 . **(C) Disminución de la expresión de MYBBP1A en muestras tumorales.** Representación de la media de los niveles de expresión de MYBBP1A en muestras normales y tumorales pareadas (N=4). El test estadístico utilizado fue una T-student (* $p > 0,05$). **(D) Tipos de carcinoma de células renales en función de los niveles de MYBBP1A.** Representación de la frecuencia de los distintos tipos de carcinomas de células renales en función de los niveles de expresión de MYBBP1A (bajo y normal).

Tampoco hay diferencias en función de los niveles de MYBBP1A en el grado histológico de los tumores (Figura 9A). Sin embargo, la reducción en la expresión de los niveles de MYBBP1A sí está relacionada con el proceso de metástasis en los tumores renales. Las muestras tumorales con niveles de expresión de MYBBP1A bajo presentaban estadios más avanzados de la enfermedad (Figura 9B) y un mayor porcentaje de casos de metástasis que las muestras con niveles de expresión de MYBBP1A normales (Figura 9C y 9D). Por último, los niveles de expresión de MYBBP1A no correlacionaban con el tratamiento recibido ni con el número de líneas de tratamiento recibidas (Figura 9E y 9F).

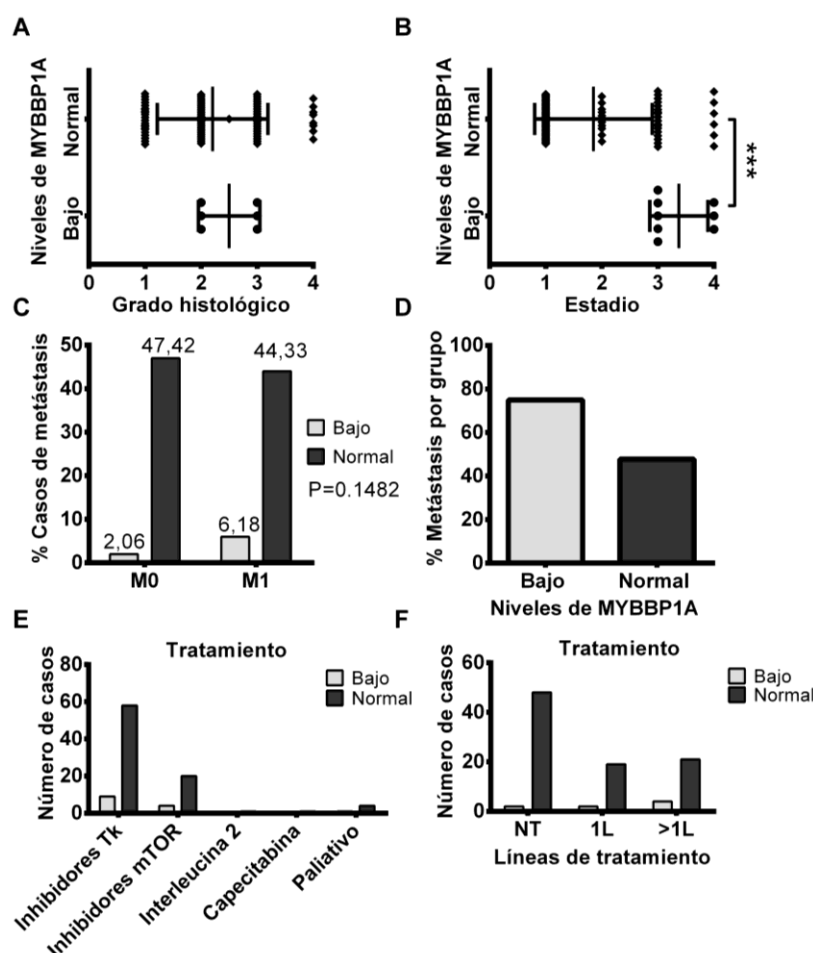


Figura 9. La pérdida de MYBBP1A favorece el fenotipo metastásico. (A) La pérdida de MYBBP1A no está asociada con el grado histológico tumoral. Representación gráfica del grado histológico de las muestras tumorales analizadas en función de los niveles de MYBBP1A. **(B) La pérdida de MYBBP1A está asociada a estadios avanzados en carcinomas de células renales.** Representación gráfica del estadio de las muestras tumorales en función de los niveles de MYBBP1A. La media de los dos grupos se comparó mediante el test estadístico T-student (***) $p < 0,001$. **(C) y (D) La pérdida de MYBBP1A favorece la aparición de metástasis.** (C) Representación gráfica del porcentaje de casos de metástasis en función de los niveles de expresión de MYBBP1A, bajo y normal. (D) Representación gráfica del porcentaje de casos de metástasis del total de muestras de cada grupo. **(E) Tipos de tratamiento de quimioterapia utilizados y su correlación con los niveles de MYBBP1A.** (TK: tirosina quinasa). **(F) Número de líneas de tratamiento recibidas.** Diagrama de barras que muestra el número de líneas de quimioterapia recibidas en los dos grupos analizados (NT: no tratados; 1L: una línea de quimioterapia; >1L: más de una línea de quimioterapia).

También analizamos la supervivencia libre de enfermedad (SLE), que se corresponde con el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la fecha de la primera recidiva o evento de progresión, y la supervivencia global (SG), que se corresponde con el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la última fecha de seguimiento de los pacientes, en función de los niveles de expresión de MYBBP1A. Al comparar la media de la SLE y SG en ambos grupos observamos un peor pronóstico tanto en SLE como en SG en el grupo de pacientes con niveles bajos de MYBBP1A (Figura 10A). Esta diferencia es más clara cuando analizamos la supervivencia mediante curvas Kaplan-Meier, especialmente en el caso de la SLE, donde podemos observar una menor SLE en el grupo de muestras tumorales con niveles de MYBBP1A bajo próxima a la significancia estadística (Figura 10B). Sin embargo, no obtuvimos resultados estadísticamente significativos probablemente debido a que el número de casos del grupo de niveles de baja expresión de MYBBP1A era muy pequeño.

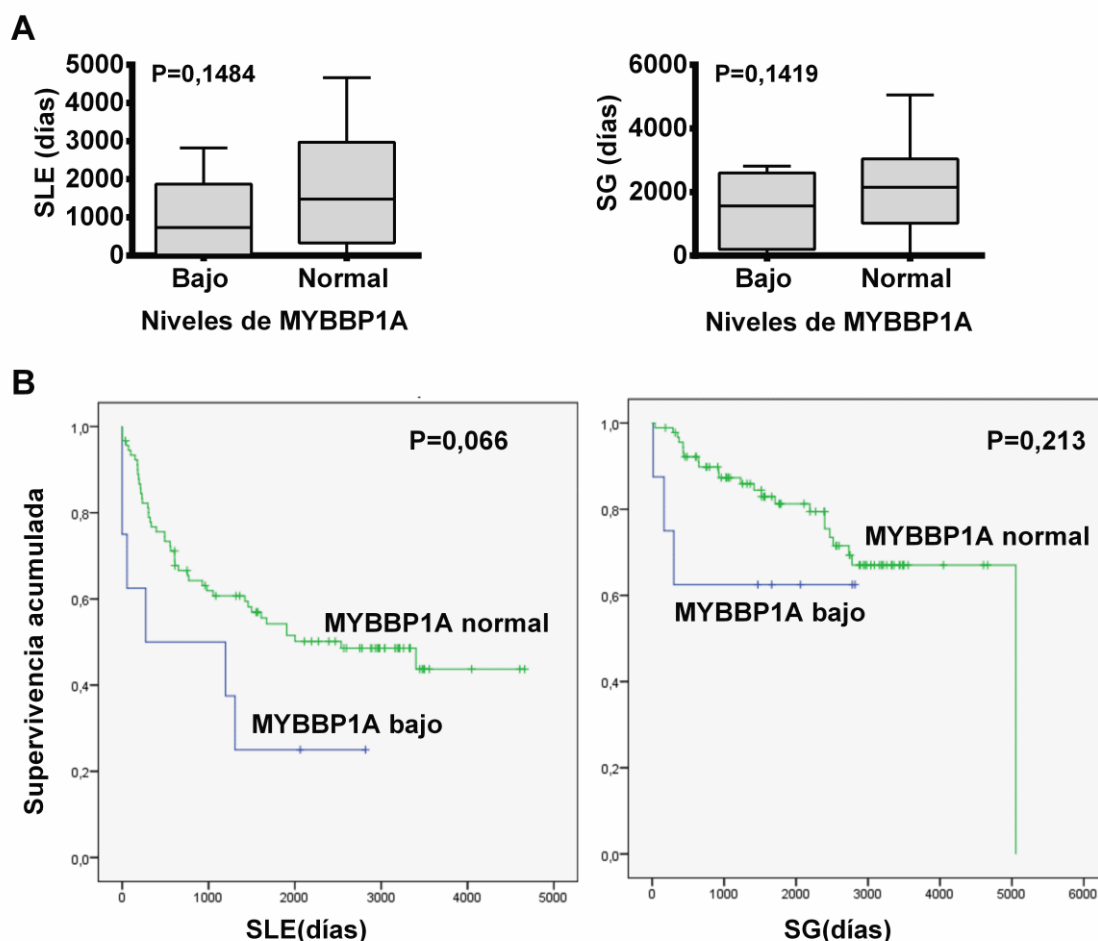


Figura 10. La pérdida de MYBBP1A reduce la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global. (A) Análisis de la SLE y SG mediante diagrama de cajas y bigotes. Se comparó la media de las variables SLE y SG en los dos grupos analizados (niveles de MYBBP1A bajo y normal) con el test estadístico T-student. **(B) Análisis de la SLE y SG mediante curvas Kaplan-Meier.** Las curvas muestran una reducción tanto de la SLE como de la SG en el grupo de nivel de expresión de MYBBP1A bajo. Se aplicó el test estadístico log-rank.

Para corroborar estos resultados con datos procedentes de otra cohorte, analizamos la supervivencia global de pacientes con carcinomas renales de células claras de la base de datos pública TCGA mediante una curva Kaplan-Meier, en la que pudimos observar una reducción de la supervivencia global estadísticamente significativa en el grupo de pacientes con bajo nivel de expresión de MYBBP1A (Figura 11).

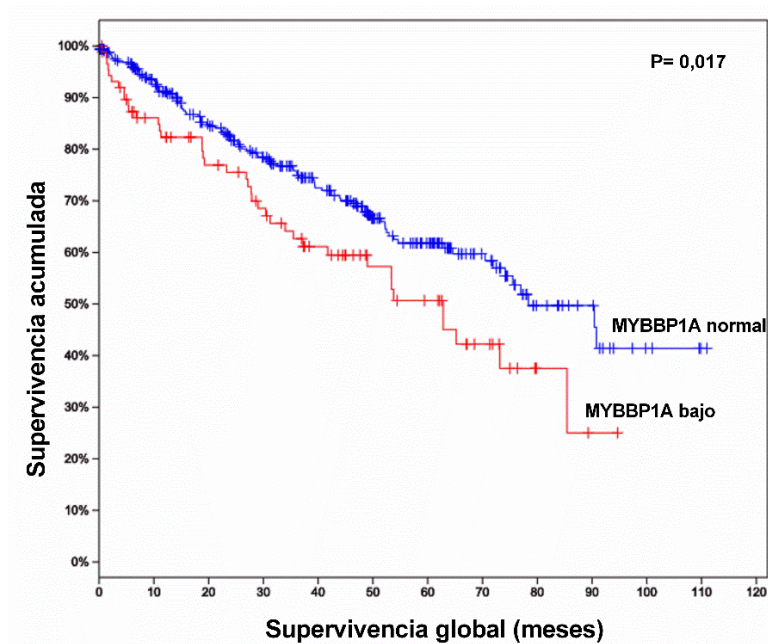


Figura 11. Análisis de la supervivencia global de pacientes con carcinomas renales de células claras de la base de datos pública TCGA. Representación gráfica de una curva Kaplan-Meier que muestra una reducción en la supervivencia global de los pacientes con niveles bajos de MYBBP1A.

Todos los resultados obtenidos en este apartado sugieren que MYBBP1A es un gen supresor de tumores cuya pérdida favorece el fenotipo metastásico.

2. *MYBBP1A* como gen supresor de tumores en células de carcinoma renal

2.1. Caracterización de líneas celulares de carcinoma renal

Con objeto de continuar con la caracterización de MYBBP1A, seleccionamos cuatro líneas celulares derivadas de carcinomas de células renales para estudiar experimentalmente el papel de *MYBBP1A* como gen supresor de tumores. En primer lugar analizamos los niveles de expresión de MYBBP1A y de algunas proteínas que interaccionan con MYBBP1A y tienen un papel relevante en procesos tumorales, como c-MYB, pVHL y p53. Los niveles de MYBBP1A eran homogéneos en todas las líneas.

Sin embargo, sólo las líneas 786-O y A498 presentaban niveles claros de c-MYB. A su vez, estas dos líneas no expresaban pVHL (Figura 12A). Las líneas ACHN y CaKi-1 presentaban las características contrarias, carecían de la expresión de la proteína c-MYB y expresaban altos niveles de pVHL, principalmente de la isoforma 3 de 19 kDa. De acuerdo a datos publicados⁹², la línea 786-O es la única que tiene la proteína p53 mutada. Aunque se detectó p53 en todas ellas, la línea 786-O presentaba los niveles de p53 más altos, como correspondería a p53 mutada (Figura 12A). También analizamos los niveles de expresión de estas proteínas y de acetilación de p53 en el residuo de lisina 382 tras mantener las líneas celulares en medio con baja concentración de glucosa, sin observar variaciones significativas en sus niveles de expresión con respecto a las distintas condiciones de glucosa en el medio (Figura 12B).

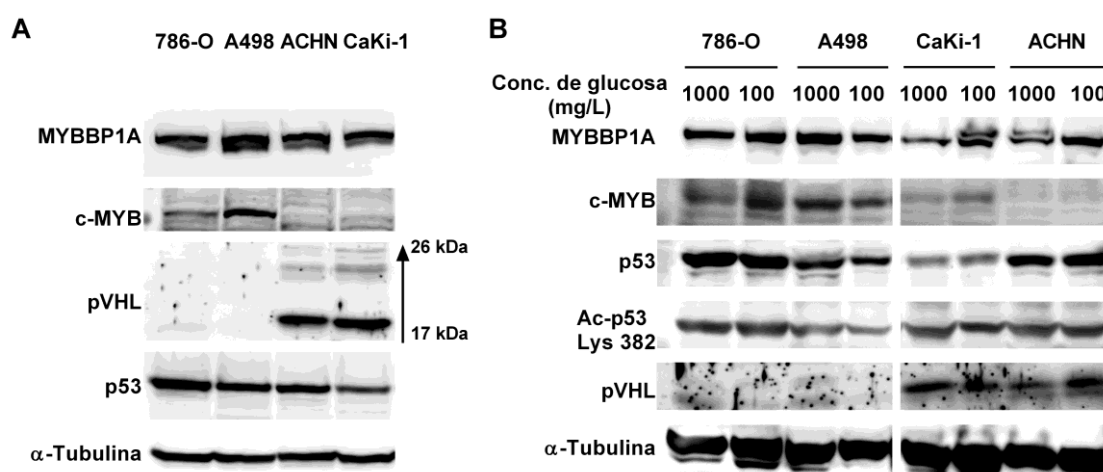


Figura 12. Caracterización molecular de las líneas celulares de carcinoma de células renales. (A) Estudio de los niveles de las proteínas MYBBP1A, c-MYB, pVHL, p53 y α -Tubulina a concentración alta de glucosa. Se cultivaron las células en medio con 4500 mg/L de glucosa, se extrajeron las proteínas y se analizaron por western blot. **(B) Estudio de los niveles de las proteínas MYBBP1A, c-MYB, pVHL, p53, Ac-p53 y α -Tubulina a concentraciones media y baja de glucosa.** Se cultivaron las células en medio con 1000 o 100 mg/L de glucosa respectivamente, se extrajeron las proteínas y se analizaron por western blot.

Además, medimos los niveles de ARNm de *MYBBP1A*, *c-MYB*, *AURKB* y *VHL* en las cuatro líneas celulares por PCR cuantitativa (RT-qPCR) (Figura 13). Observamos que las líneas A498 y 786-O tenían niveles más altos de ARNm de *MYBBP1A* que las líneas ACHN y CaKi-1. La línea A498 presentaba la expresión más alta del ARNm de *c-MYB*, sin haber grandes diferencias entre las otras tres líneas celulares. La línea 786-O expresaba el nivel más elevado del ARNm de *AURKB* y la línea CaKi-1 el nivel más bajo (Figura 13). Finalmente, los niveles de expresión del ARNm de la variante 2 del gen *VHL* eran homogéneos en las cuatro líneas celulares. Sin embargo, cuando usamos una sonda que medía los niveles de expresión de las variantes 1 y 2,

observamos una diferencia clara entre la línea Caki-1 y las otras 3 líneas celulares, siendo CaKi-1 la línea con mayor expresión (Figura 13).

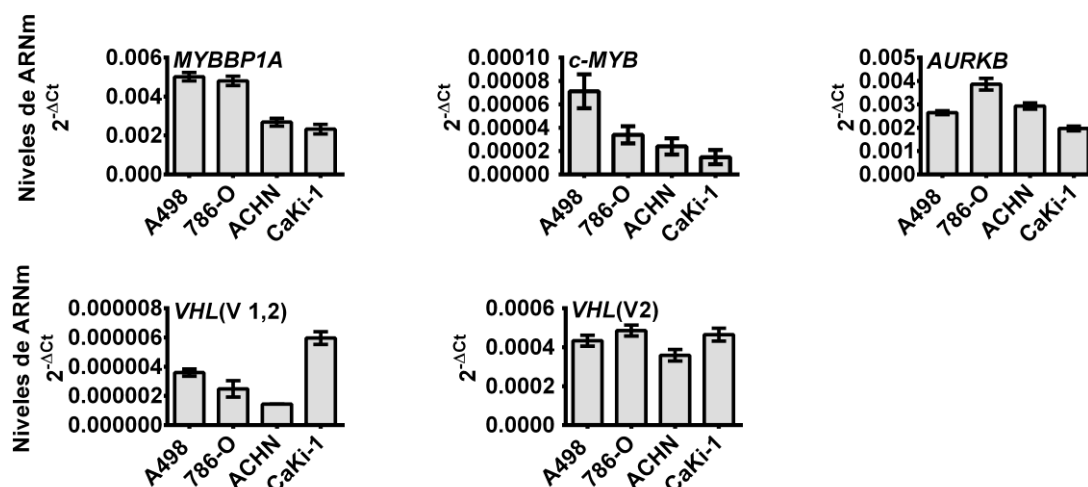


Figura 13. Niveles de expresión de los genes *MYBBP1A*, *c-MYB*, Aurora quinasa B (*AURKB*) y *VHL* en líneas de carcinoma de células renales. Cuantificación de los niveles de ARNm por RT-qPCR. Se utilizaron dos sondas Taqman para el gen *VHL*, una que mide las variantes 1 y 2 (V 1,2) del ARNm y otra que se mide únicamente la variante 2 (V2).

2.2. Ausencia de translocación de MYBBP1A al nucleoplasma en condiciones limitantes de glucosa

Se ha descrito que MYBBP1A se transloca del nucléolo al nucleoplasma cuando se producen situaciones de estrés, entre las que se encuentra la limitación de la glucosa disponible en el medio ^{40,52-56}. Así pues, decidimos estudiar la translocación de MYBBP1A en nuestras líneas de carcinoma renal a baja concentración de glucosa. Para ello, intentamos reproducir en líneas de carcinoma renal el experimento realizado en líneas de cáncer de mama por Kumazawa et al⁴². Cultivamos las células a dos concentraciones de glucosa diferentes (1000 mg/L y 100 mg/L) y comparamos la localización de MYBBP1A en ambas situaciones por microscopía de fluorescencia confocal, utilizando la señal de la proteína UBF como control de localización del nucléolo. Sorprendentemente, no observamos una disminución de la cantidad de MYBBP1A en el nucléolo y correspondiente aumento de la cantidad de MYBBP1A en el nucleoplasma al disminuir la concentración de glucosa a 100 mg/L, como estaba descrito que ocurre en líneas de cáncer de mama (Figura 14A). Únicamente observamos diferencias en la localización nucleolar de MYBBP1A en la línea ACHN, en la que detectamos un aumento de la localización nucleolar de MYBBP1A a 100 mg/L de glucosa (Figura 14C).

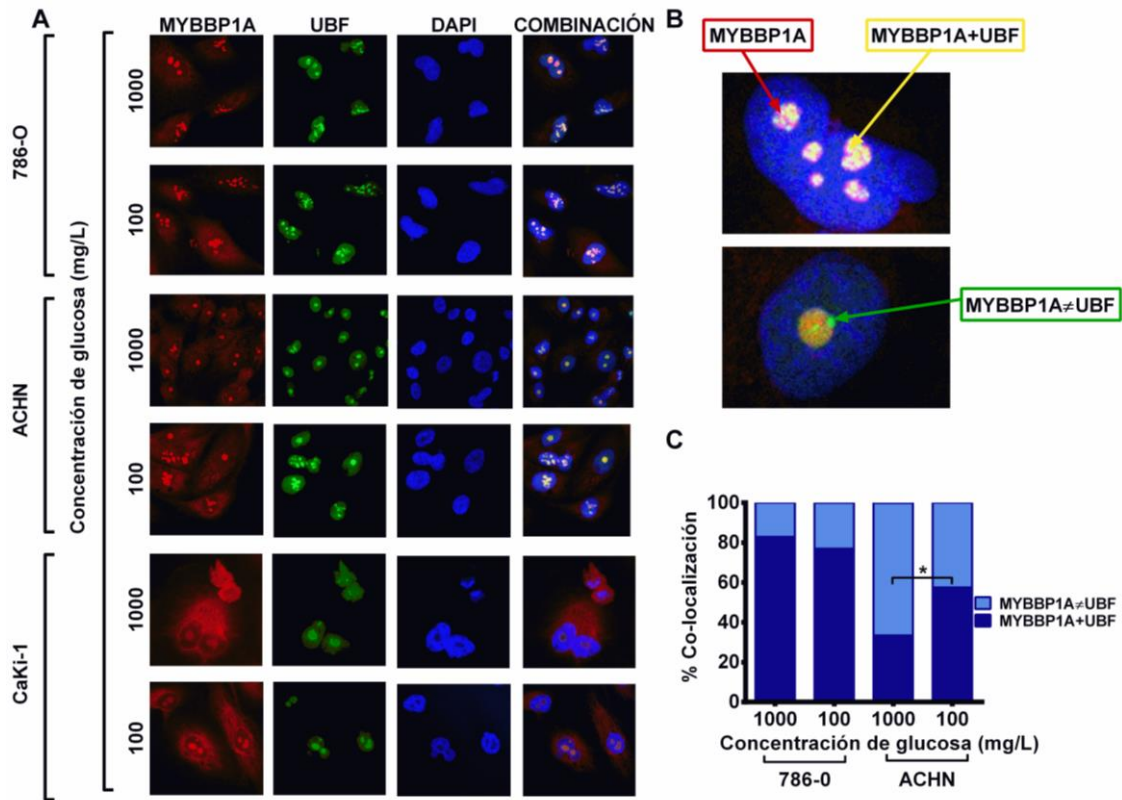


Figura 14. La disminución de la concentración de glucosa no induce la translocación de MYBBP1A del nucléolo al nucleoplasma. (A) Localización de MYBBP1A en las líneas 786-O, ACHN y CaKi-1 a distintas concentraciones de glucosa. Las células se tiñeron usando anticuerpos contra UBF (control nucleolar), contra MYBBP1A y el colorante DAPI (control nuclear). La tinción no muestra aumento de la cantidad de MYBBP1A en el nucleoplasma a 100 mg/L con respecto a 1000 mg/L de glucosa en ninguna de las líneas celulares. **(B) Ejemplo de co-localización de MYBBP1A y UBF usada en la cuantificación.** **(C) Porcentaje de co-localización de MYBBP1A y UBF en las líneas 786-O y ACHN.** Se cuantificó el porcentaje de localización nucleolar de MYBBP1A a través de la co-localización de MYBBP1A y UBF (MYBBP1A+UBF) a distintas concentraciones de glucosa. Se observó el aumento de la localización nucleolar de MYBBP1A en la línea ACHN a 100mg/L de glucosa con respecto a 1000 mg/L de glucosa. El análisis estadístico se realizó con el test Chi-cuadrado (* $p < 0,05$).

También comprobamos si se producía un aumento en la cantidad de p53 en el nucleoplasma mediado por MYBBP1A en nuestras líneas celulares al disminuir la concentración de glucosa, ya que se ha descrito que la translocación de MYBBP1A al nucleoplasma induce el aumento de la acetilación y la acumulación de p53^{40, 52-56}. Cultivamos las células a 1000 y 100 mg/L y estudiamos la localización de MYBBP1A y p53 por microscopía de fluorescencia confocal, sin observar ni la translocación de MYBBP1A al nucleoplasma ni la acumulación de p53 en el nucleoplasma cuando reducíamos la concentración de glucosa a 100 mg/L (Figura 15).

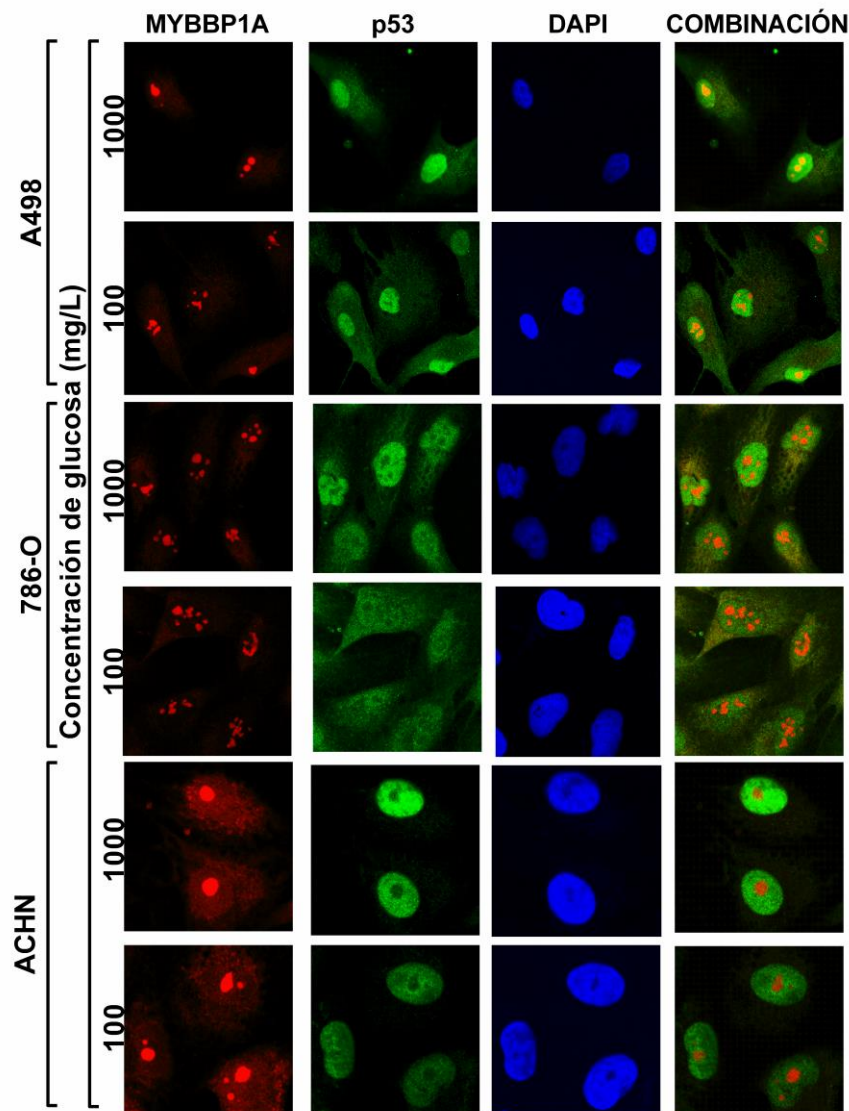


Figura 15. La limitación de glucosa no induce la acumulación de p53 en líneas de carcinoma renal. Se tiñeron las células con DAPI (control nuclear) y con los anticuerpos contra MYBBP1A y p53. No se observó translocación de MYBBP1A al nucleoplasma a 100 mg/L de glucosa con respecto a 1000 mg/L de glucosa y por tanto no se detectó acumulación de p53 en el nucleoplasma.

2.3. Efecto de la sobreexpresión de *MYBBP1A*

Una vez caracterizadas las líneas de carcinoma renal, el siguiente paso consistió en estudiar si la sobreexpresión de *MYBBP1A* tenía algún efecto en las propiedades tumorales de las células. Para ello transfectamos las cuatro líneas celulares con un vector que expresaba el gen *MYBBP1A* o con un vector vacío y realizamos un ensayo de clonabilidad para medir la capacidad de crecimiento. Realizamos este experimento con dos vectores diferentes, pcDNA3 y pWZL, que expresaban el gen *MYBBP1A* con distintos marcadores de selección y distintos promotores de expresión eucariótica. En ambos casos observamos que la sobreexpresión de *MYBBP1A* reducía el número de

colonias formadas prácticamente a cero (Figura 16). Este efecto se producía en todas las líneas independientemente de si expresaban o no pVHL o c-MYB, indicando que *MYBBP1A* suprime el crecimiento celular independientemente del contexto molecular.

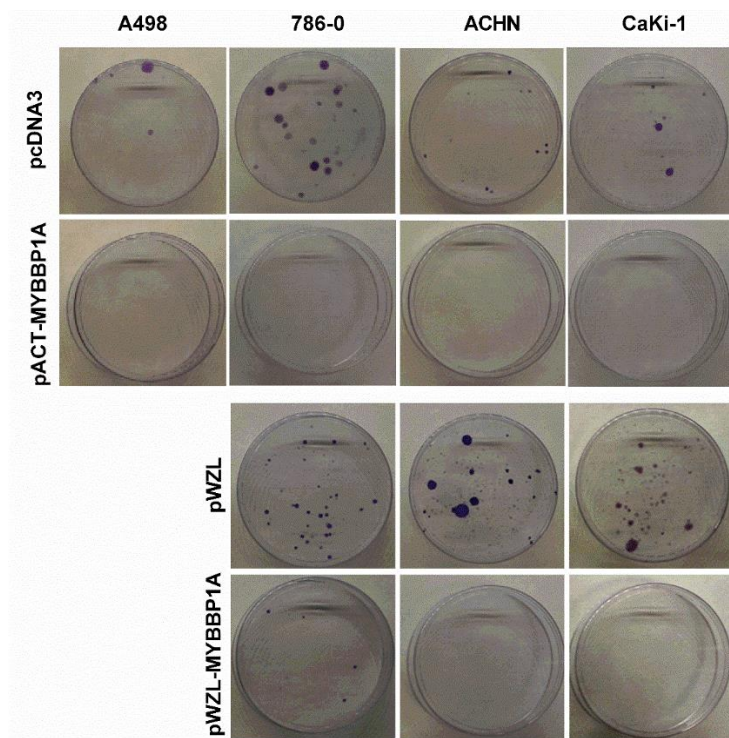


Figura 16. La sobreexpresión de *MYBBP1A* suprime el crecimiento de las líneas celulares de carcinoma de células renales. Imágenes del resultado del ensayo de clonabilidad en las líneas A498, 786-O, ACHN y CaKi-1. Se observan colonias en las líneas transfectadas con el vector vacío, sin observarse colonias en las líneas transfectadas con el ADNc de *MYBBP1A* (excepto en el caso de la línea 786-O pWZL-*MYBBP1A* donde se apreciaba un número muy reducido de colonias).

Tabla 8. Cuantificación de las colonias formadas en el ensayo de clonabilidad tras la sobreexpresión de *MYBBP1A*.

Línea celular	pCDNA3 (% colonias)	pACT <i>MYBBP1A</i> (% colonias)	pWZL (% colonias)	pWZL <i>MYBBP1A</i> (% colonias)
A498	100	0	nd	nd
786-O	100	0	100	14
ACHN	100	0	100	0
CaKi-1	100	0	100	0

El número de colonias formadas por las células que expresaban el vector vacío se tomó de referencia (100%) y el número de colonias formadas por las células que sobreexpresaban *MYBBP1A* se refirió al 100%. nd: no determinado.

2.4. Efecto de la reducción de la expresión de *MYBBP1A* y su relación con metástasis

Tras observar que la sobreexpresión de *MYBBP1A* suprimía el crecimiento celular en las líneas de carcinoma renal analizamos el efecto de la reducción de la expresión de *MYBBP1A*. Para ello, realizamos una transfección estable en las cuatro líneas celulares con varios shARNs contra *MYBBP1A*. Primero transfectamos la línea 786-O con un vector control que expresaba una secuencia “*scramble*” que no afecta a la

expresión de ningún gen de la célula y con 4 shARNs con distintas secuencias contra MYBBP1A y elegimos el shARN que mejor reducía los niveles de MYBBP1A (Figura 17A). A continuación transfectamos el resto de las líneas celulares con el vector control y el shARN seleccionado (shARN4) y validamos la reducción de los niveles de MYBBP1A tanto a nivel de proteína (Figura 17B) como de ARNm (Figura 17C).

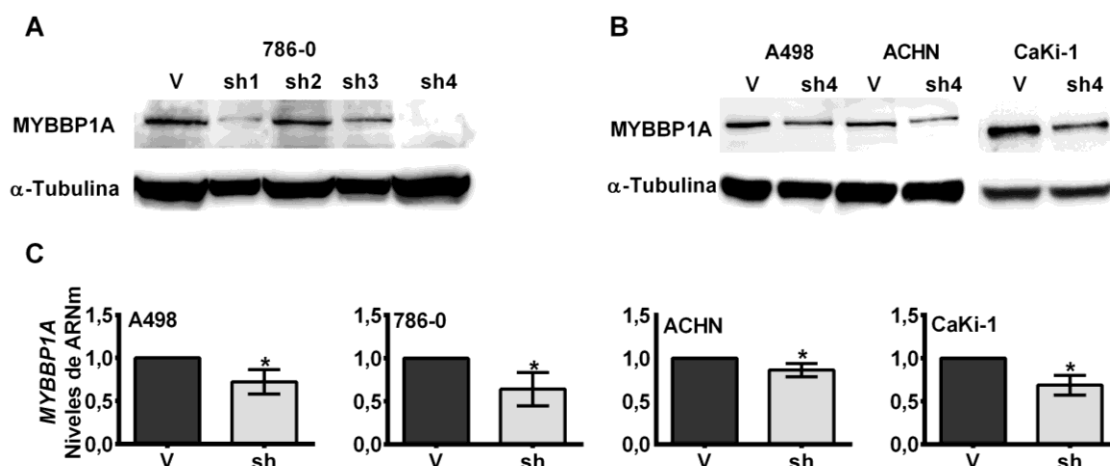


Figura 17. Validación del shARN contra MYBBP1A. (A) Elección del mejor shARN contra MYBBP1A. Western blot en el que se observa el efecto de los 4 shARN contra MYBBP1A. Tanto el sh1 como el sh4 reducen los niveles de MYBBP1A pero el sh4 produce una reducción mayor. (B) Validación del shARN contra MYBBP1A en las líneas A498, ACHN y CaKi-1. Western blot en el que se observa la reducción de los niveles de MYBBP1A en las líneas transfectadas con el shARN contra MYBBP1A con respecto a las líneas con el vector control. (C) Cuantificación de los niveles de ARNm de MYBBP1A. Validación del efecto del sh4 contra MYBBP1A por RT-qPCR. Se normalizaron los niveles de expresión de las células transfectadas con el sh4 en función de los niveles de las células transfectadas con el vector control. Para el análisis estadístico se utilizó el test t-student. La gráfica muestra la media de 3 repeticiones independientes realizadas en triplicado (* $p < 0,05$).

Una vez generadas las líneas estables con niveles reducidos de MYBBP1A o con el vector control, realizamos una serie de ensayos para medir las propiedades tumorales de las células en dos condiciones: concentración alta de glucosa (4500 mg/L) y concentración baja de glucosa (100 mg/L), con objeto de estudiar si las células respondían al estrés por reducción de glucosa de forma diferente al reducir la expresión de MYBBP1A. En primer lugar realizamos una curva de crecimiento de cada línea celular en las distintas condiciones de glucosa para comparar la tasa de proliferación de las líneas que expresaban el vector control y las líneas con niveles bajos de MYBBP1A. Observamos que las líneas A498 y 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A crecían más rápido que las líneas con el vector control tanto en glucosa alta como baja, aunque en la línea A498 la diferencia era mayor en glucosa alta y en la línea 786-O en glucosa baja (Figura 18). Sin embargo, las líneas ACHN y CaKi-1 con niveles reducidos de MYBBP1A crecían a la misma velocidad que las líneas control (Figura 18).

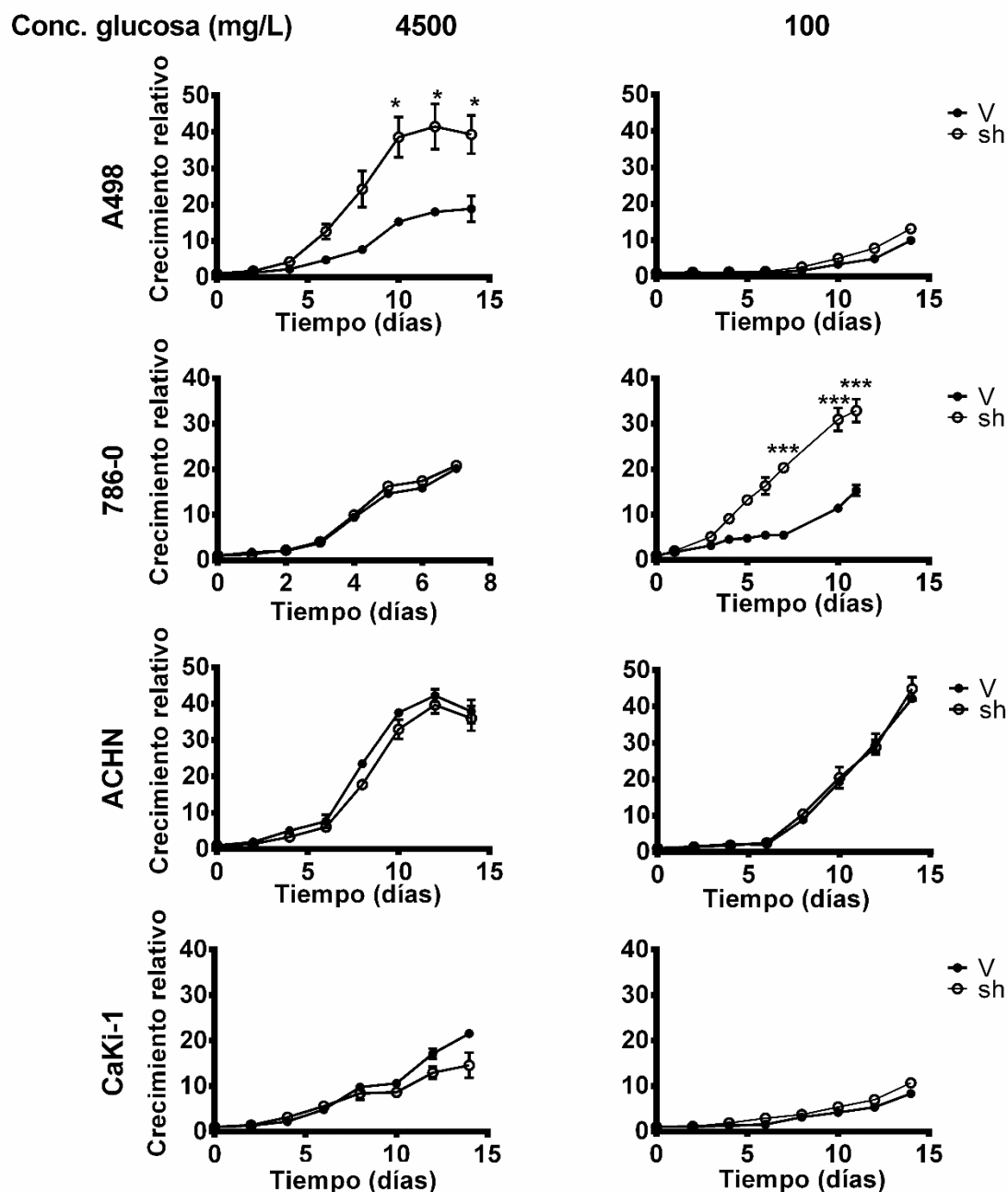


Figura 18. Efecto de la reducción de los niveles de MYBBP1A en la proliferación de las líneas celulares de carcinoma de células renales. Curvas de crecimiento de las líneas A498, 786-O, ACHN y CaKi-1 en medio de cultivo con 4500 mg/L y 100 mg/L de concentración de glucosa. Experimento representativo de 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

Para comprobar que este resultado no se debía a efectos inespecíficos del shARN contra *MYBBP1A* en otras secuencias del ADN celular, transfectamos de forma estable las líneas 786-O y ACHN con otro vector control (V2) y otro shARN contra MYBBP1A (sh2), distinto a los 4 shARNs anteriores. Comprobamos por western blot (Figura 19A) y RT-qPCR (Figura 19B) la reducción de los niveles de MYBBP1A con este nuevo shARN y medimos el crecimiento a glucosa alta de las líneas celulares

generadas. Observamos de nuevo que la línea 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A crecía más rápido que la línea control, sin producirse este aumento en la línea ACHN, en la que observamos que las células control crecían incluso más rápido que las células con niveles reducidos de MYBBP1A. De este modo confirmamos que el aumento de la tasa de proliferación al reducir los niveles de MYBBP1A en la línea 786-O y la ausencia de este efecto en la línea ACHN se produce específicamente por reducción de los niveles de MYBBP1A.

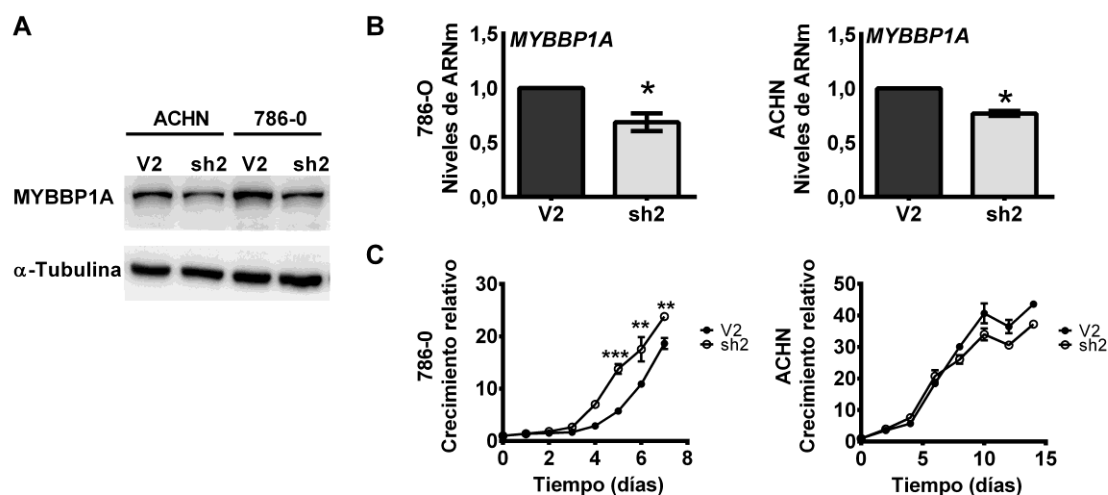


Figura 19. Efecto de la reducción de los niveles de MYBBP1A mediante un segundo shARN contra MYBBP1A en la proliferación de las líneas 786-O y ACHN. (A) Validación del efecto del sh2 contra MYBBP1A por western blot. Western blot de las líneas 786-O y ACHN transfectadas con el vector pRS (V2) y un shARN contra MYBBP1A distinto a los 4 anteriores (sh2). Se observa que el sh2 también reduce los niveles de MYBBP1A en ambas líneas celulares. **(B) Validación del efecto del sh2 contra MYBBP1A por RT-qPCR.** Se cuantificaron los niveles del ARNm de MYBBP1A por Q-RT-PCR. Se normalizaron los niveles de expresión de las células transfectadas con el sh2 en función de los niveles de expresión de las células transfectadas con el vector vacío (V2). Para el análisis estadístico se utilizó el test t-student (* $p < 0,05$). La gráfica muestra la media de 3 repeticiones independientes. **(C) Curvas de crecimiento de las líneas 786-O y ACHN a 4500 mg/L.** Se midió la tasa de proliferación de las líneas transfectadas con el sh2 y con el vector vacío (V2) a 4500 mg/L, observándose de nuevo un aumento del crecimiento al reducir los niveles de MYBBP1A en la línea 786-O únicamente.

A continuación medimos la capacidad de las células de formar colonias en ausencia de contacto celular. Para ello realizamos un ensayo de clonogenicidad en el que sembramos las células a baja densidad (100 ó 1000 células en placas de 10 cm), esperamos hasta que formaron colonias (10-15 días) y cuantificamos tanto el número como el tamaño de las colonias formadas. Observamos que la línea A498 con niveles reducidos de MYBBP1A formaba más colonias y de mayor tamaño que la línea con el vector control (Figura 20). En la línea 786-O no había diferencias en el número de colonias entre las células con niveles bajos de MYBBP1A y las células control, sin embargo las colonias de las células con bajo MYBBP1A eran de mayor tamaño (Figura 20). Al igual que en el ensayo anterior, no había diferencias estadísticamente

significativas entre las células con niveles reducidos de MYBBP1A y las células control en las líneas ACHN y CaKi-1 (Figura 20).

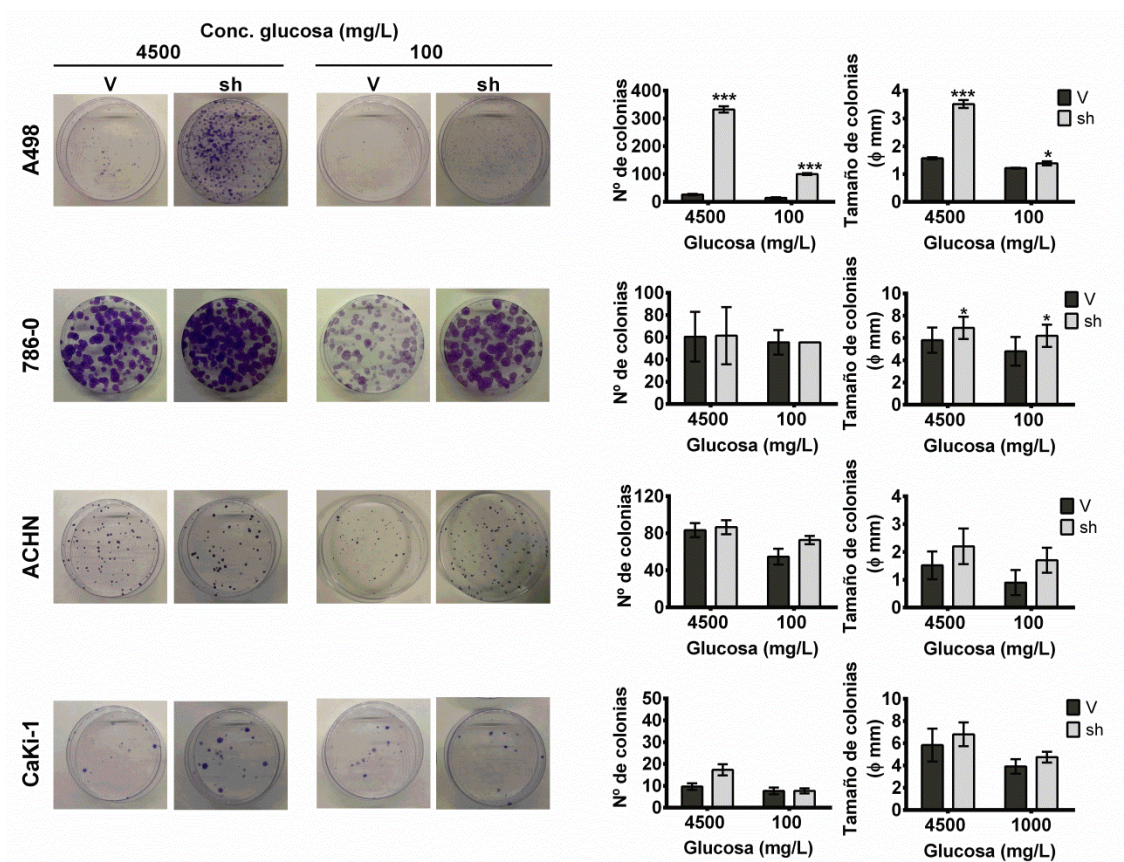


Figura 20. Efecto de la reducción de MYBBP1A en la capacidad de formación de colonias de las células. Ensayo de clonogenicidad en las líneas A498, 786-O, ACHN y CaKi-1. Se sembraron las células a baja densidad, 100 células por placa de 10 cm en las líneas 786-O y CaKi-1 y 1000 células por placa de 10 cm en las líneas A498 y ACHN. Tras 10-15 días se cuantificó el número y el tamaño de las colonias formadas. Se representa la media \pm desviación típica de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Se aplicó el test t-student para el análisis estadístico (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

También medimos la capacidad de crecimiento de forma independiente de anclaje de las células con el ensayo de formación de colonias en agar blando. Sembramos las células transfectadas en matrices de agar blando a 4500 y 100 mg/L de glucosa y las dejamos crecer durante 3-6 semanas, según la línea celular. Tras este periodo de tiempo cuantificamos las colonias formadas en cada caso. Observamos un aumento en el número de colonias en las células con niveles reducidos de MYBBP1A con respecto a las células control en la línea A498 (Figura 21). Sin embargo obtuvimos el resultado contrario en la línea ACHN, la disminución del número de colonias formadas en las células con niveles bajos de MYBBP1A con respecto a las células control (Figura 21). No encontramos diferencias entre las células con bajo MYBBP1A y las células control en la línea CaKi-1 (Figura 21). En este ensayo no pudimos evaluar la

capacidad de formación de colonias de la línea 786-O porque las células migraban rápidamente al fondo de la placa sin llegar a formar colonias (Figura 21).

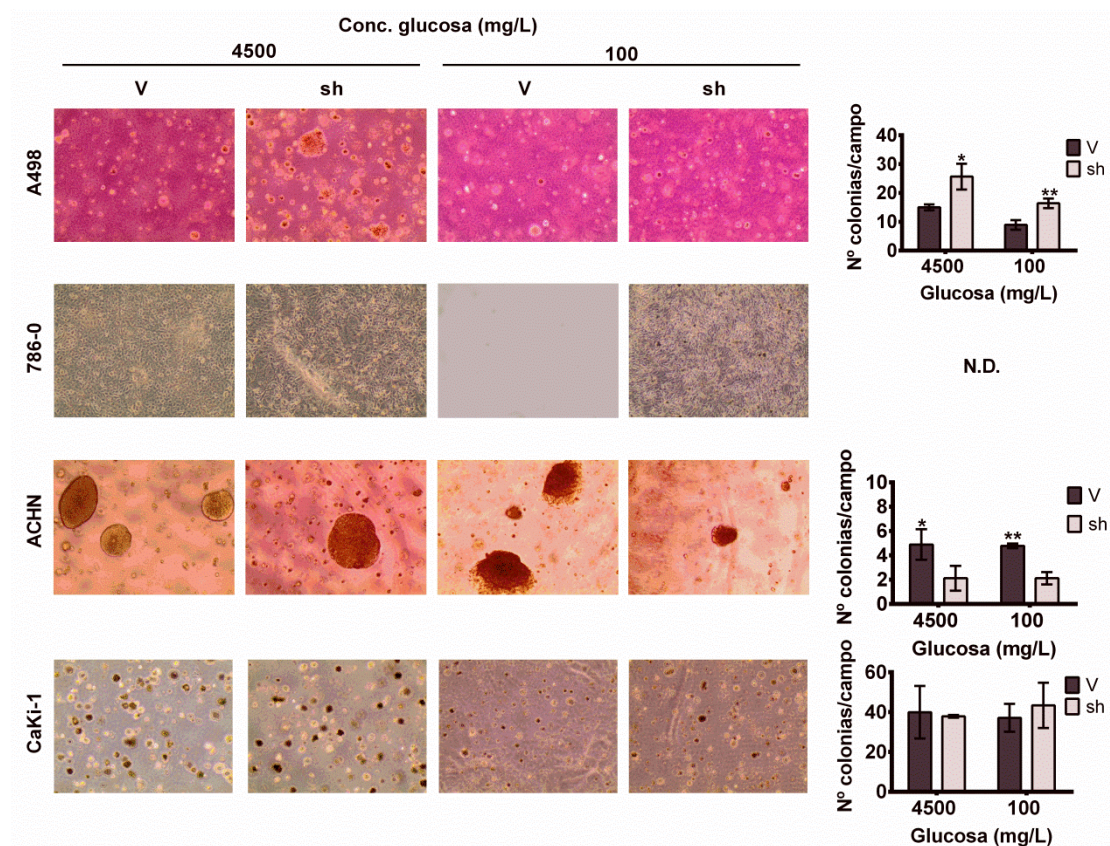


Figura 21. Efecto de la reducción de MYBBP1A en el crecimiento independiente de anclaje en líneas celulares de carcinoma de células renales. Se realizó el ensayo de formación de colonias en agar blando en glucosa alta (4500 mg/L) y baja (100 mg/L) en las líneas A498, 786-O, ACHN y CaKi-1. Tras 3-6 semanas de crecimiento se tomaron fotos y se cuantificó el número de colonias. Se representa gráficamente la media del número de colonias por campo \pm desviación típica de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Se analizaron los datos con el test estadístico t-student ($*p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$). Para la línea 786-O se muestran fotos del fondo de la placa puesto que no se pudo realizar el ensayo porque las células migraban rápidamente al fondo de la placa.

Como habíamos observado que la línea 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A migraba rápidamente al fondo de la placa en el ensayo de agar blando, estudiamos la migración celular de todas las líneas celulares mediante el ensayo de cierre de herida “*wound-healing*”. Observamos que las células con niveles reducidos de MYBBP1A presentaban una tendencia de mayor velocidad de migración con respecto a las células control en todas las líneas celulares, especialmente en la condición de concentración de glucosa más baja, pero esta diferencia era estadísticamente significativa únicamente en la línea 786-O (Figura 22).

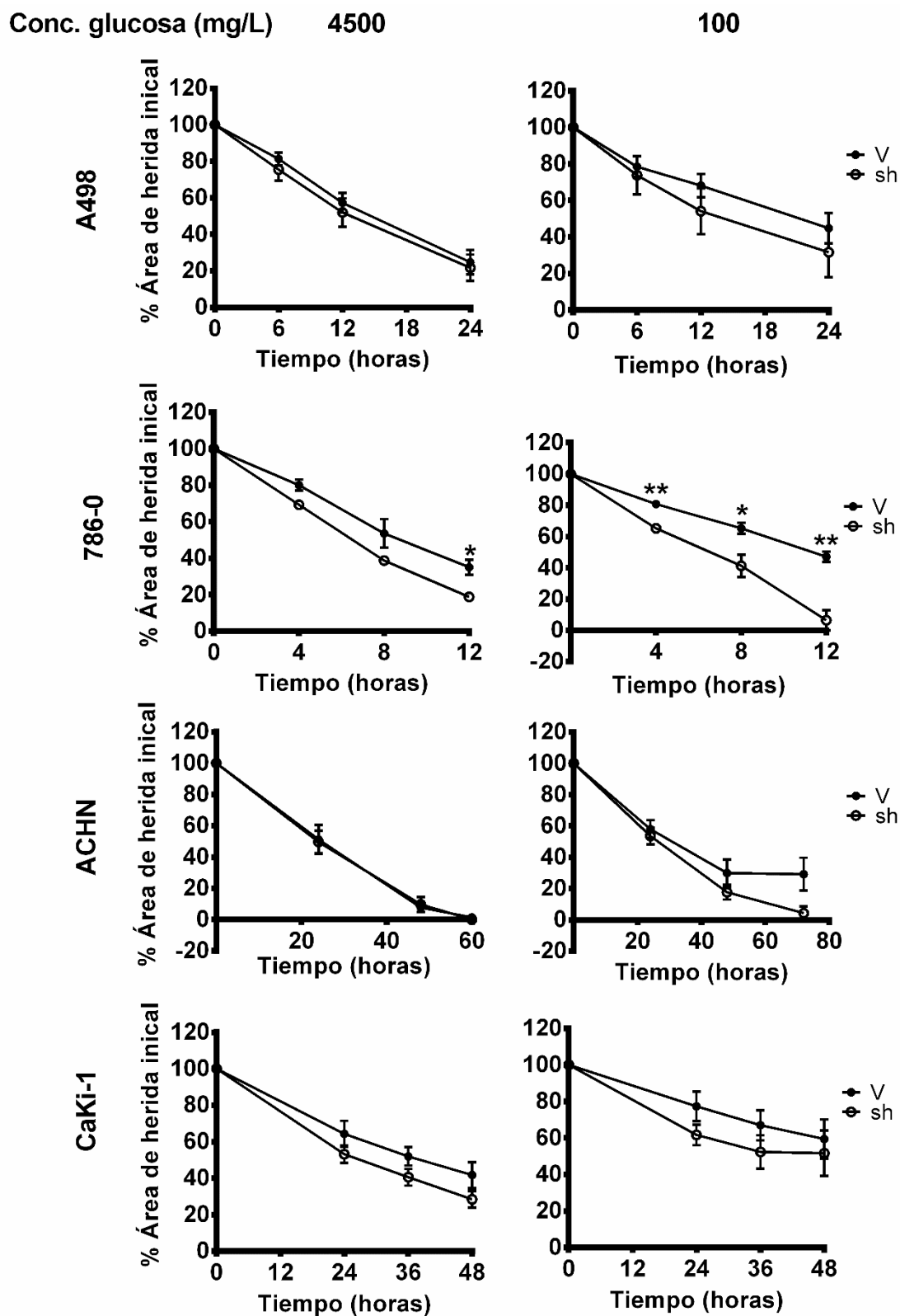


Figura 22. Efecto de la reducción de los niveles de MYBBP1A en la capacidad de migración de líneas celulares de carcinoma de células renales. Se cuantificó la migración celular mediante el ensayo de cierre de herida en todas las líneas celulares. Se muestra el porcentaje del área de la herida inicial en función del tiempo a 4500 y 100 mg/L de glucosa. En las gráficas se representan la media \pm desviación típica de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Se analizaron los datos con el test estadístico t-student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Finalmente analizamos el efecto de la reducción de los niveles de MYBBP1A *in vivo* generando modelos de *xenografts* de cada línea celular. Para ello inyectamos un millón de células de cada una de las líneas celulares en el flanco derecho de la pata trasera de ratones inmunodeprimidos. Observamos que los tumores formados por línea A498 con bajo MYBBP1A crecían más rápido que los tumores formados por la línea A498 control (Figura 23). Además, dos ratones de la línea A498 con niveles reducidos de MYBBP1A murieron de metástasis antes de que se detectara el tumor primario, en cambio las células control no dieron lugar a ningún caso de metástasis (Figura 24). Obtuvimos resultados similares en la línea 786-O, en este caso sólo se formaron tumores en un ratón de cada condición y el ratón al que se le inyectaron células con niveles bajos de MYBBP1A murió de metástasis antes de que el tumor primario alcanzara un gran tamaño (Figura 24). Con el fin de obtener una mayor eficiencia en la formación de tumores, repetimos el experimento inyectando 5 millones de la línea 786-O transfectada con el sh2 y su respectiva línea control. En este experimento observamos que la línea 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A formaba tumores de mayor tamaño que la línea control (Figura 23). Por otro lado, las líneas ACHN y CaKi-1 con niveles reducidos de MYBBP1A formaron tumores iguales o incluso más pequeños que los tumores de las células control (Figura 23).

Todos los ensayos realizados en este apartado muestran un aumento de las propiedades tumorales cuando se reducen los niveles de MYBBP1A en las líneas celulares que expresan c-MYB y no expresan pVHL, excepto en el ensayo de cierre de herida en el que se observa un efecto similar en todas las líneas celulares. De este modo se confirma el papel de MYBBP1A como supresor tumoral y su relación con el fenotipo metastásico en un contexto molecular concreto, en las líneas celulares que presentan altos niveles de c-MYB y no expresan pVHL.

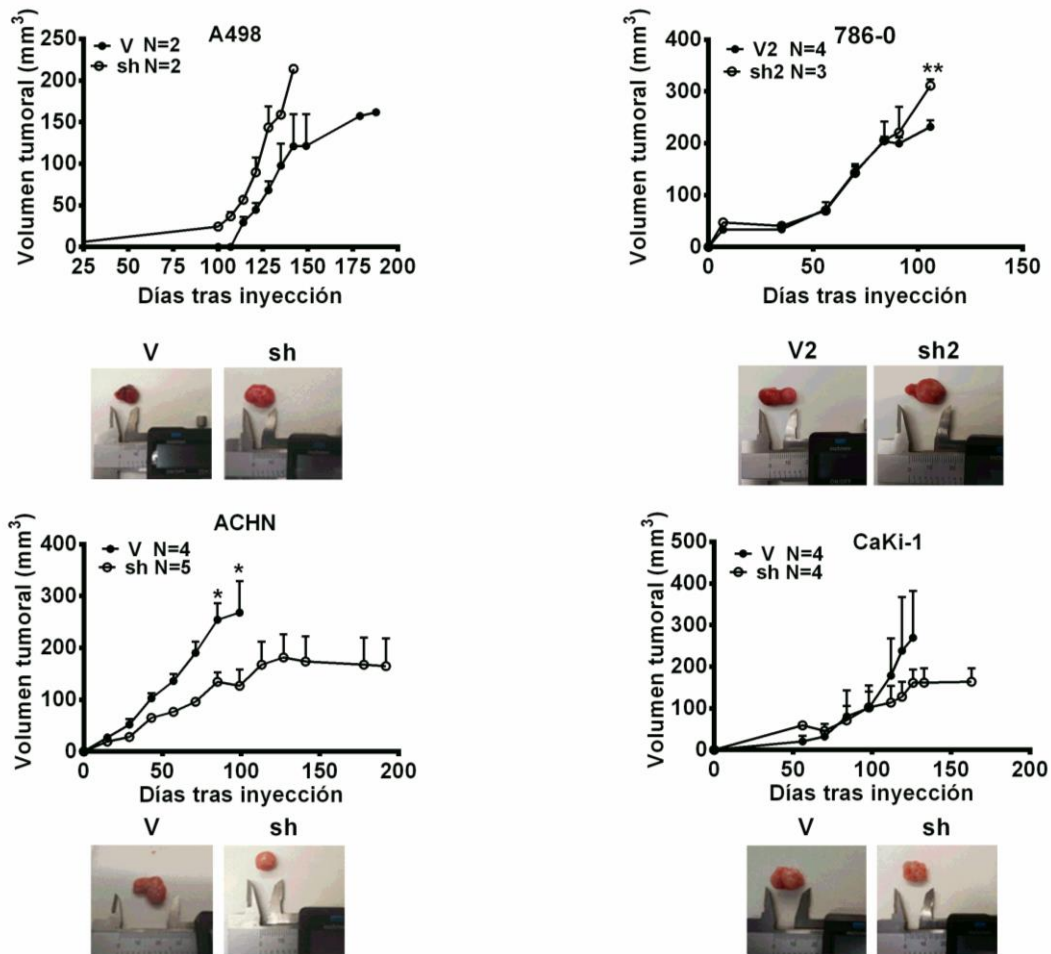


Figura 23. Las líneas A498 y 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A forman tumores de mayor tamaño que las células control cuando se inyectan en ratones inmunodeprimidos. Se representa la media del volumen tumoral + error estándar de la media. Se muestra una foto representativa de los tumores formados por cada línea celular. Se analizaron los datos con el test estadístico t-student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

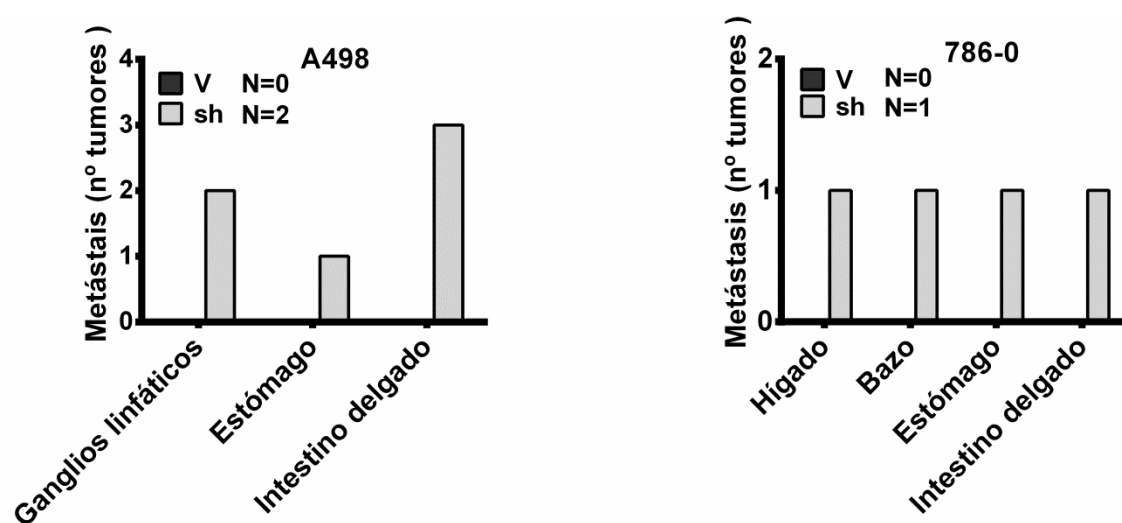


Figura 24. Las líneas A498 y 786-O con niveles bajos de MYBBP1A favorecen la aparición de metástasis cuando se inyectan en ratones inmunodeprimidos. Diagrama de barras en el que se representa el número de metástasis observadas en cada órgano.

2.5. Efecto de la reducción de la expresión de MYBBP1A en el fenotipo de célula madre

Después de observar la relación entre la pérdida de MYBBP1A y el desarrollo de metástasis estudiamos el efecto de la reducción de MYBBP1A en las propiedades de célula madre de las células tumorales, puesto que se ha propuesto que las células madres tumorales son las responsables de los procesos de recaída y metástasis². En primer lugar analizamos el fenotipo de los clones que se forman al sembrar las células a baja densidad, ya que se ha descrito su relación con las capacidades de crecimiento⁸¹⁻⁸⁵. En función del fenotipo los clones se clasifican en holoclones, constituidos por células con propiedades de célula madre, paraclones, formados por células diferenciadas que no son capaces de reconstituir un cultivo y meroclones, compuestos por células con características intermedias entre holoclones y paraclones⁸¹⁻⁸⁶. Para realizar este estudio sembramos las células a baja densidad, analizamos el fenotipo de los clones individuales formados a los 14-20 días y realizamos el recuento de los distintos tipos de clones presentes en cada placa. Observamos el aumento del porcentaje de holoclones en las líneas A498 y 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A con respecto a las células control. Este aumento se producía tanto a alta como a baja concentración de glucosa, pero cada línea presentaba un comportamiento distinto, el aumento era mayor a glucosa alta que a glucosa baja en la línea A498 y al revés en la línea 786-O (Figura 25). Sin embargo, no observamos este aumento en las líneas ACHN y CaKi-1 con niveles bajos de MYBBP1A (Figura 25).

Por otro lado, se ha descrito la existencia de poblaciones celulares capaces de crecer en suspensión en medio sin suero formando agrupaciones celulares llamadas tumoresferas^{82,93,94}. Estas tumoresferas se caracterizan por su capacidad de auto-renovación tras ser disgregadas, por estar enriquecidas en progenitores epiteliales multipotentes⁹⁵ y por presentar altos niveles de expresión de marcadores de células madre tumorales⁹⁶. En base a las características que presentan, medimos la formación de tumoresferas en nuestras líneas celulares. Observamos que tanto la línea A498 como la línea 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A formaban un mayor número de tumoresferas que las células control (Figura 26). En cambio, no encontramos diferencias en el número de tumoresferas entre las líneas ACHN con niveles bajos de MYBBP1A y las líneas control (Figura 26).

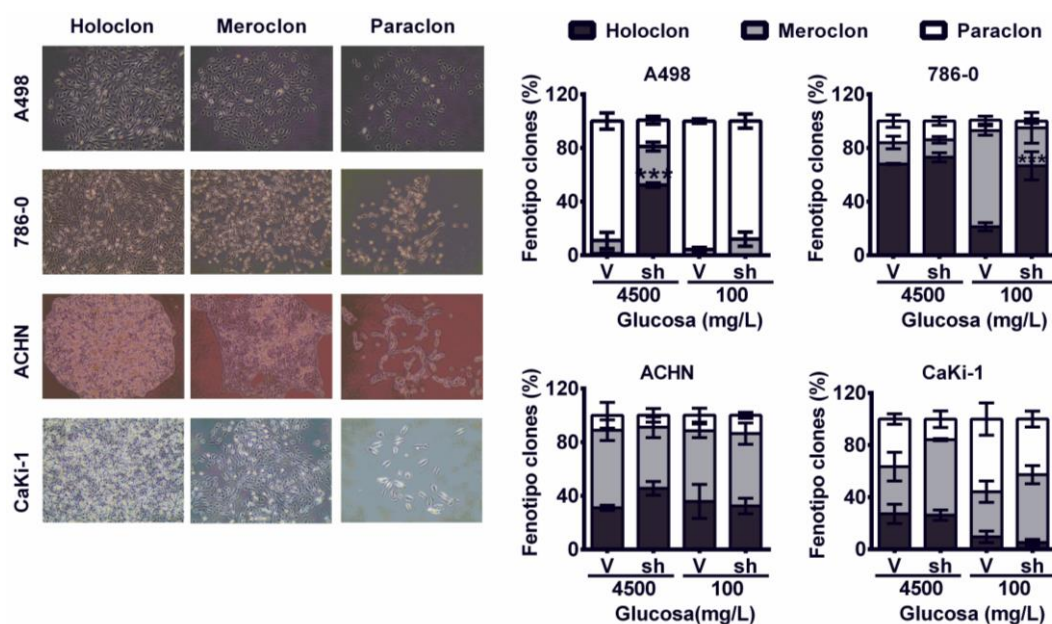


Figura 25. Efecto de la reducción de MYBBP1A en el fenotipo de los clones. A la izquierda se muestran fotos representativas de los holoclones, meroclones y paraclones de las 4 líneas celulares. A la derecha se representa gráficamente la media \pm SD de los porcentajes de los distintos tipos de clones de las células control y las células con niveles bajos de MYBBP1A. El experimento fue realizado 3 veces independientes en triplicado y el análisis estadístico se realizó con el test t-student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

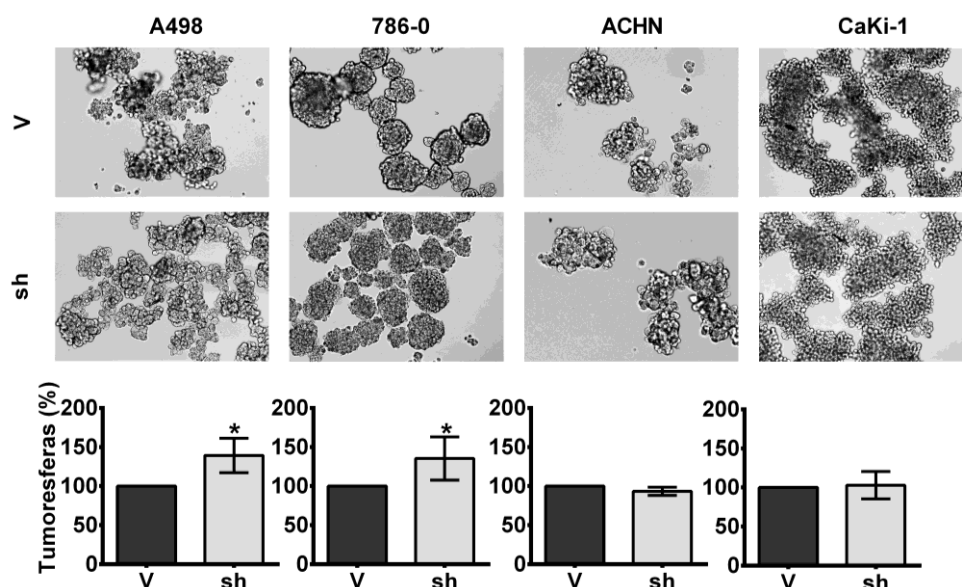


Figura 26. Efecto de la reducción de los niveles de MYBBP1A en la formación de tumoresferas en líneas de carcinoma de células renales. En la parte superior se muestran fotos representativas de las tumoresferas formadas al crecer las células control y las células con niveles reducidos de MYBBP1A en suspensión en medio sin suero. En la parte inferior se representa la media \pm desviación típica del porcentaje del número de esferas formadas en las líneas con niveles bajos de MYBBP1A en relación al número de esferas formadas en las líneas control. Los experimentos se repitieron un mínimo de 3 veces independientes en triplicado. El análisis estadístico se realizó con el test t-student (* $p < 0,05$).

Para explorar en mayor profundidad la capacidad de las células de crecer en suspensión en medio sin suero, analizamos la capacidad de formar una esfera a partir de una célula aislada. Con este fin tripsinizamos las células, las separamos por

citometría de flujo y sembramos una célula por pocillo en medio sin suero. A los 30-45 días cuantificamos el número y el tamaño de las esferas formadas. Observamos un aumento en el número y en el tamaño de las esferas en la línea A498 con niveles reducidos de MYBBP1A con respecto a la línea control tanto a glucosa alta como baja (Figura 27). No apreciamos diferencias en el número de esferas entre la línea ACHN con niveles reducidos de MYBBP1A y la línea control, pero el tamaño de las esferas era menor en las células con MYBBP1A bajo (Figura 27). El número de esferas de las células con niveles reducidos de MYBBP1A aumentaba a glucosa alta pero disminuía a glucosa baja con respecto a las células control en la línea CaKi-1, aunque no había diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de las esferas en ninguna de las dos concentraciones de glucosa (Figura 27). Sin embargo, no pudimos cuantificar el número de esferas en la línea 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A porque en estas células con crecimiento muy rápido el alto consumo de glutamina no permitía mantener la concentración de glutamina estable en el medio en periodos largos de tiempo y las células no crecían bien.

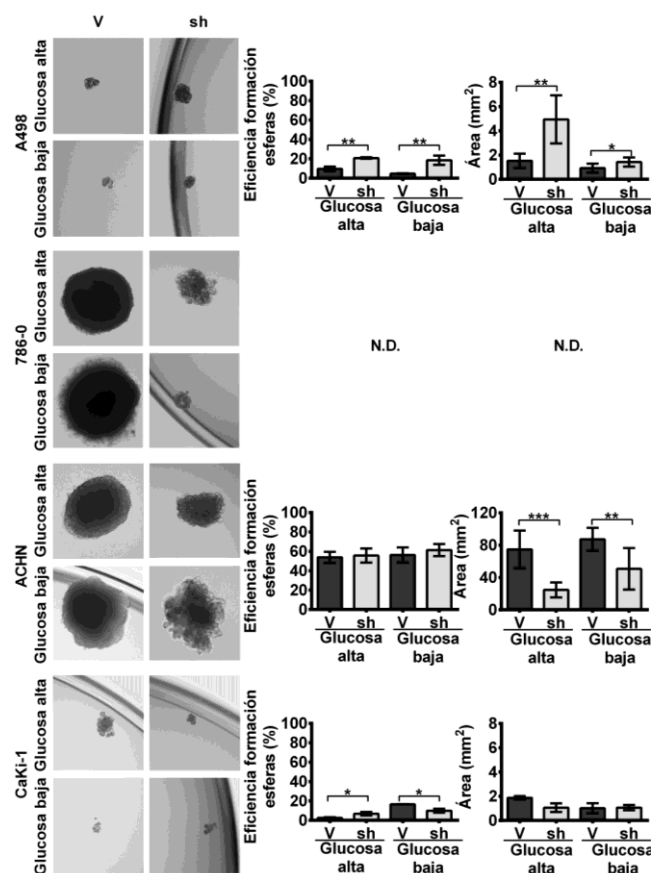


Figura 27. Ensayo de formación de esferas a partir de una célula aislada. En la parte izquierda de la figura se muestran fotos representativas de las esferas formadas en cada una de las líneas celulares a glucosa alta (4500 mg/L) y a glucosa baja (100 mg/L). En la parte derecha se representa la media \pm desviación típica de la eficiencia de formación de esferas (porcentaje de pocillos con esferas del total de pocillos sembrados). El análisis estadístico se realizó con el test t-student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). N.D.: no determinado.

A continuación medimos la expresión de algunos factores de transcripción implicados en rutas de señalización que regulan la pluripotencia de las células madre (*NANOG*, *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *MYC* Y *BMI1*)⁹⁷⁻¹⁰². Observamos un aumento en la expresión de los genes *NANOG* en las líneas A498 y 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A con respecto a las células control (Figura 28). En la línea 786-O con niveles bajos de MYBBP1A se producía también el aumento de la expresión de *OCT4* y *SOX2* (Figura 28). Sin embargo, no vimos diferencias en la expresión de ninguno de estos genes entre las células control y las células con niveles bajos de MYBBP1A en las líneas ACHN y CaKi-1 (Figura 28).

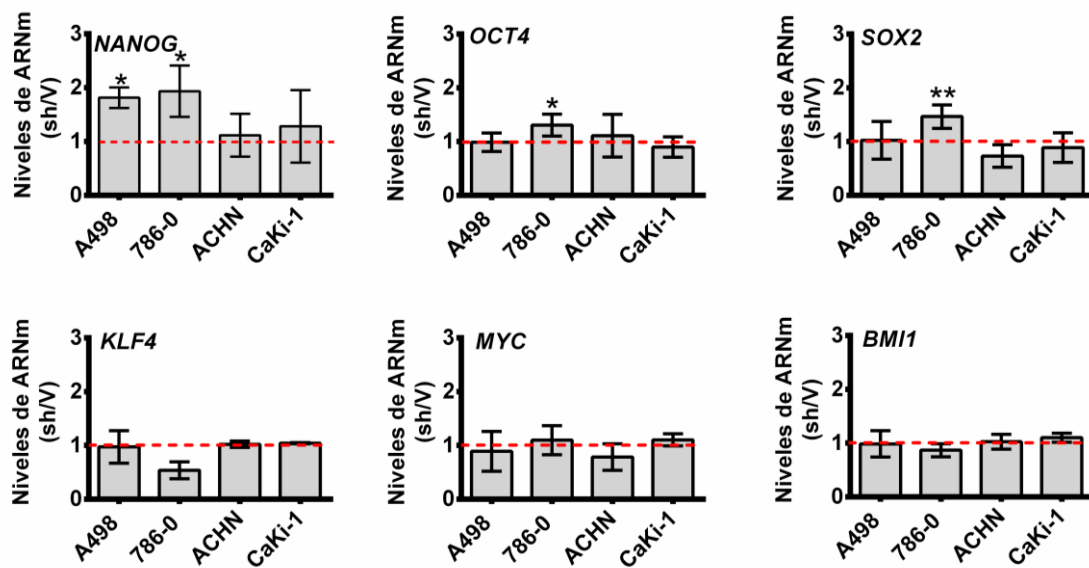


Figura 28. Efecto de la reducción de MYBBP1A en la expresión de genes relacionados con el fenotipo de célula madre. Cuantificación de los niveles de ARNm de los genes *NANOG*, *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *MYC* y *BMI1* por RT-qPCR. Las gráficas muestran la relación de los niveles de expresión de cada gen de las células con niveles reducidos de MYBBP1A (sh) entre la expresión de las células control (V). El análisis estadístico se realizó con el test t-student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Los experimentos se repitieron un mínimo de 3 veces en triplicado

También medimos la expresión de genes implicados en la transición epitelio-mesénquima (*TWIST1*, *FOXC2*, *VIM* y *SNAI1*), puesto que se ha descrito que la inducción de este proceso está asociada a la aparición de las células madres tumorales¹⁰³. La expresión de *TWIST1* aumentaba en las líneas A498 y 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A con respecto a las células control, pero no observamos este aumento en las líneas ACHN y CaKi-1 con bajo MYBBP1A (Figura 29). Sin embargo, observamos un aumento en la expresión de *VIM* en la línea ACHN con niveles bajos de MYBBP1A en comparación con las células control (Figura 29).

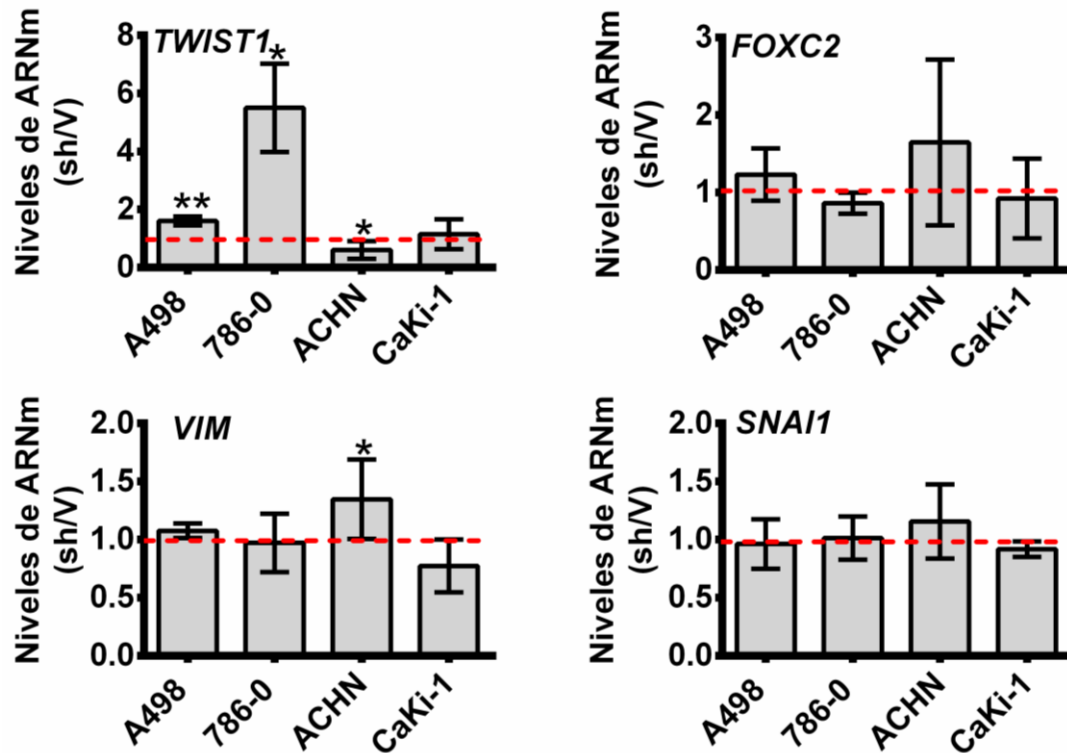


Figura 29. Efecto de la reducción de MYBBP1A en la expresión de genes involucrados en la transición epitelio-mesénquima. Cuantificación de los niveles de ARNm de los genes *TWIST1*, *FOXC2*, *VIM* y *BMI1* por RT-qPCR. Las gráficas muestran la relación de los niveles de expresión de cada gen de las células con niveles reducidos de MYBBP1A (sh) entre la expresión de las células control (V). El análisis estadístico se realizó con el test t-student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Los experimentos se repitieron un mínimo de 3 veces en triplicado

Con el fin de corroborar que la reducción de los niveles de MYBBP1A induce la aparición del fenotipo de célula madre en las células tumorales, repetimos algunos de estos experimentos en las líneas 786-O y ACHN transfectadas con el segundo sh. Concretamente realizamos el ensayo de tumoresferas y medimos la expresión de los genes involucrados en la regulación de la pluripotencia de las células madre en los que habíamos observado diferencias significativas. De nuevo observamos un pequeño incremento en el número de tumoresferas formadas por las células con niveles bajos de MYBBP1A con respecto a las células control en la línea 786-O (Figura 30A). También aumentaba la expresión de *NANOG* y *SOX2* en la línea 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A en comparación con la línea control, pero este aumento no se producía en la línea ACHN (Figura 230B).

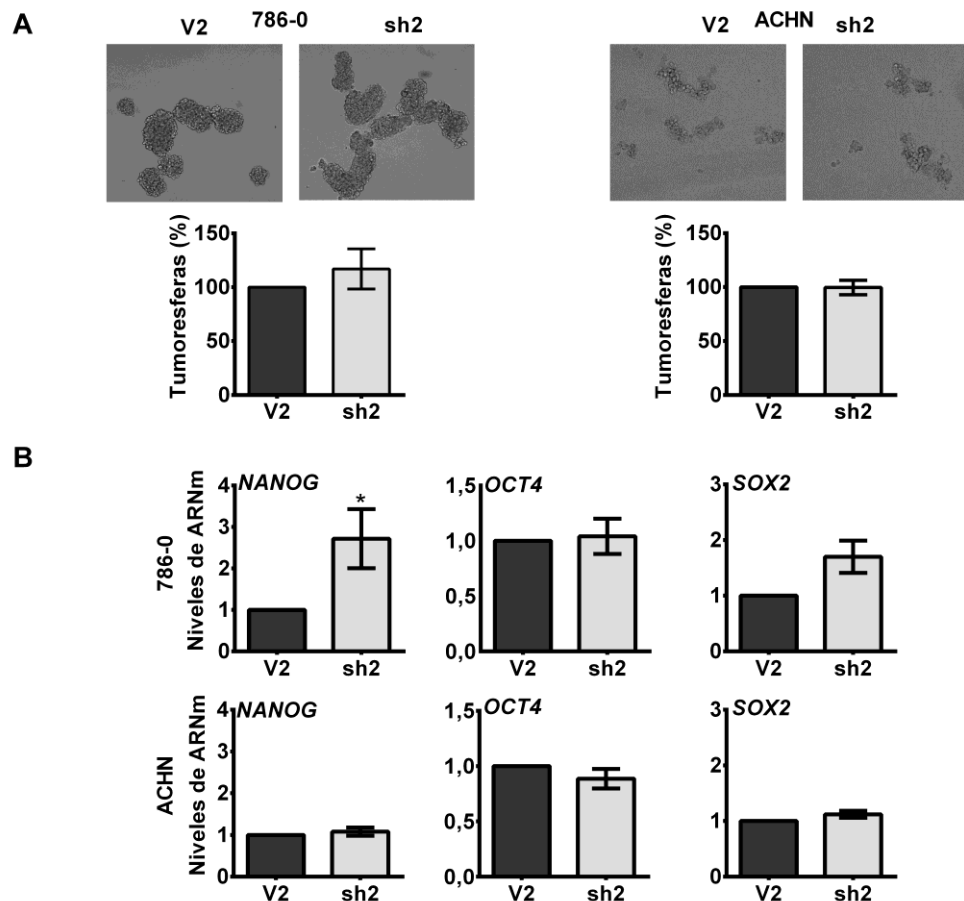


Figura 30. Efecto del segundo shARN frente a MYBBP1A en el fenotipo de célula madre en las líneas 786-O y ACHN. (A) Ensayo de formación de tumoresferas en las líneas 786-O y ACHN. Se muestran fotos representativas de las tumoresferas formadas por cada línea celular. En las gráficas se representa la media + desviación típica del porcentaje del número de esferas formadas en las líneas con niveles bajos de MYBBP1A en relación al número de esferas formadas en las líneas control. Los experimentos se repitieron un mínimo de 3 veces en triplicado. Se realizó el análisis estadístico con el test t-student sin obtener diferencias estadísticamente significativas. **(B) Cuantificación de los niveles de ARNm de los genes NANOG, OCT4 y SOX2 por RT-qPCR.** Las gráficas muestran los niveles de expresión de cada gen en las células con niveles reducidos de MYBBP1A (sh2) en relación a la expresión de las células control (V2). El análisis estadístico se realizó con el test t-student (* $p < 0,05$).

3. La reducción de MYBBP1A induce la activación de c-MYB

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que en nuestro modelo existe una relación funcional entre MYBBP1A y c-MYB que se traduce en una ventaja proliferativa de las células tumorales. Para estudiar este efecto biológico en profundidad, analizamos en primer lugar si existía una co-localización de MYBBP1A y c-MYB en las líneas celulares de carcinoma renal a distintas concentraciones de glucosa. Observamos una co-localización clara entre MYBBP1A y c-MYB en el núcleo, específicamente en el nucléolo, de las líneas que contenían altos niveles de c-MYB, A498 y 786-O, en todas las concentraciones de glucosa (Figura 31). No observamos esta co-localización en la línea ACHN, que no expresa c-MYB (Figura 31).

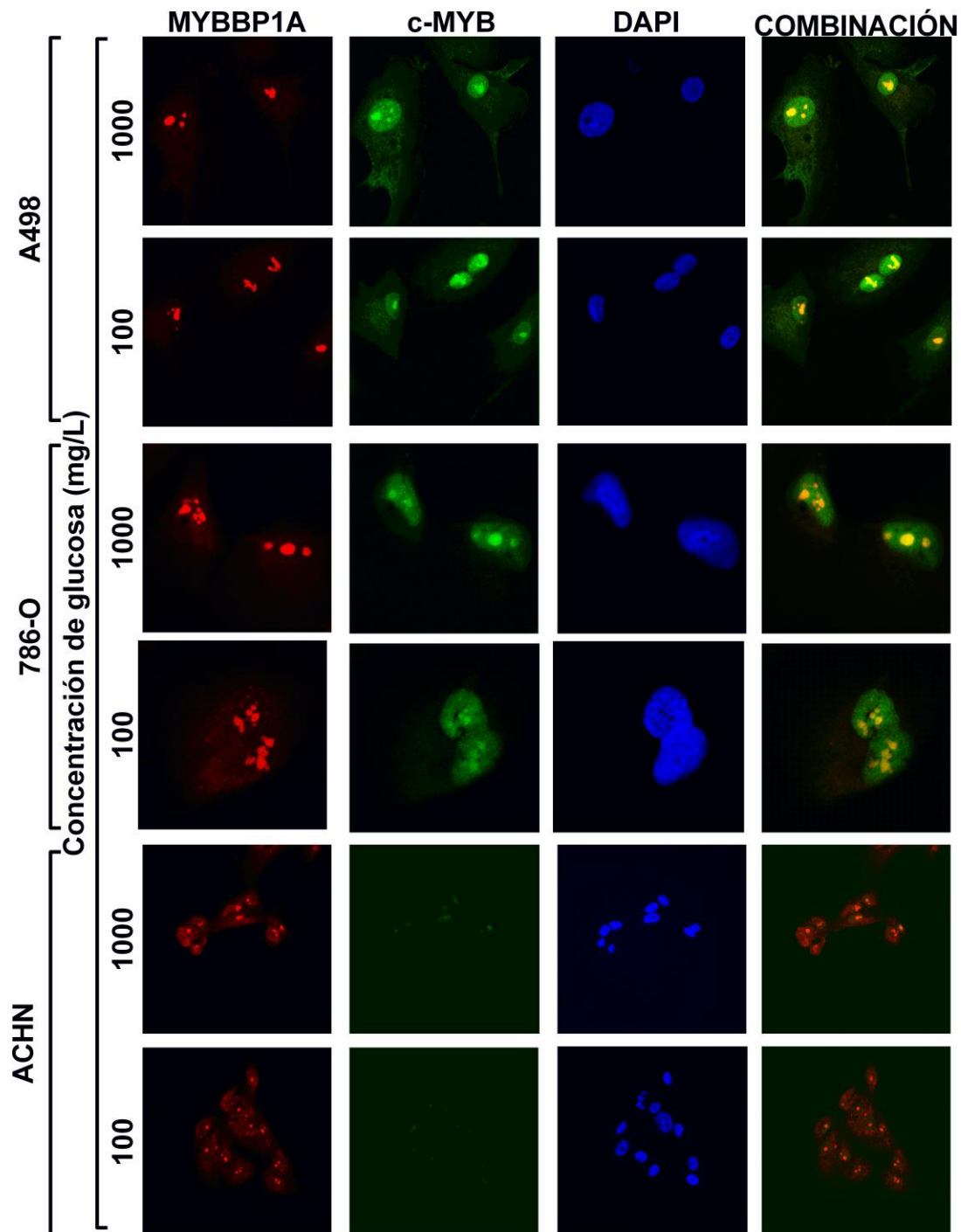


Figura 31. Co-localización nucleolar de MYBBP1A y c-MYB en líneas de carcinoma de células renales con altos niveles de c-MYB. Se tiñeron las células con los anticuerpos contra MYBBP1A y c-MYB y con DAPI (control nuclear). Se observó co-localización entre MYBBP1A y c-MYB en el nucléolo de las líneas A498 y 786-O tanto a 1000 como a 100 mg/L de glucosa.

A continuación medimos los niveles de expresión de algunos genes diana de c-MYB, cuya transcripción se produce directamente por la activación c-MYB, como *CD34* y *CXCR4*. Observamos el aumento de la transcripción de estos genes

solamente en las líneas A498 y 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A con respecto a las células control, pero no encontramos este efecto en las líneas ACHN y CaKi-1 (Figura 32A). Obtuvimos resultados similares cuando medimos la expresión de estos genes en las líneas 786-O y ACHN transfectadas con el segundo shARN contra MYBBP1A, aumentando la transcripción de *CD34* y *CXCR4* únicamente en la línea 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A en comparación con las células control (Figura 32B).

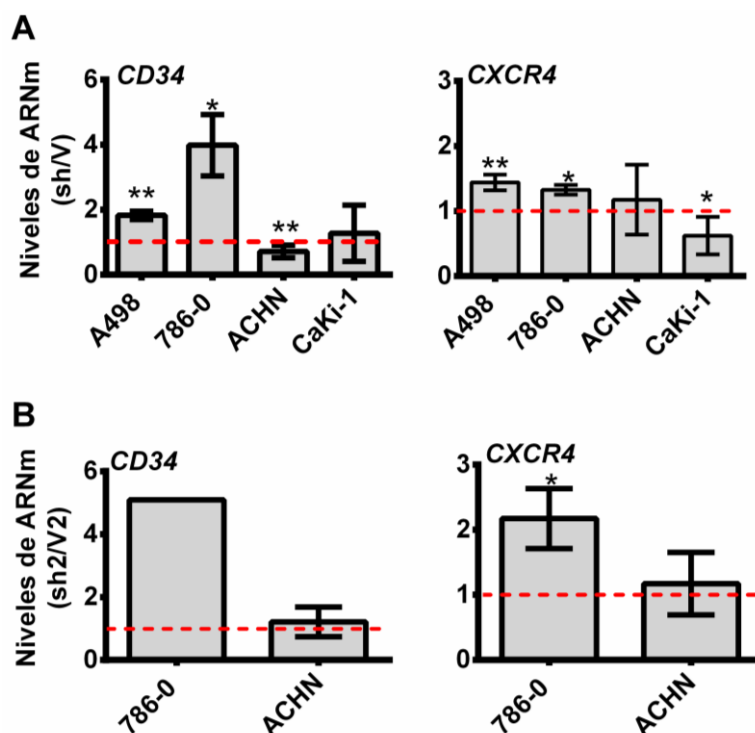


Figura 32. Efecto de la disminución de los niveles de MYBBP1A en la inducción de la transcripción de genes diana de c-MYB. (A) Cuantificación de los niveles de ARNm de los genes diana de c-MYB *CD34* y *CXCR4* por RT-qPCR. **(B)** Cuantificación de los niveles de ARNm de los genes diana de c-MYB *CD34* y *CXCR4* en las líneas transfectadas con el segundo shARN contra MYBBP1A (sh2) por RT-qPCR. Las gráficas muestran la relación de los niveles de expresión de cada gen en las células con niveles reducidos de MYBBP1A entre la expresión de las células control de 3 experimentos realizados en triplicado. El análisis estadístico se realizó con el test t-student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Como habíamos observado previamente un aumento de las propiedades biológicas características de las células madres en las líneas con niveles altos de c-MYB y reducidos de MYBBP1A, y se ha descrito que *CD34* es un marcador de superficie de células progenitoras de varios tejidos¹⁰⁴, estudiamos el porcentaje de células que expresaban *CD34*. Para ello, medimos por citometría de flujo el porcentaje de células *CD34*⁺ de cada línea celular. De nuevo aumentaba el porcentaje de células *CD34*⁺ en las líneas A498 y 786-O con niveles bajos de MYBBP1A, sin producirse este aumento en las líneas ACHN y CaKi-1 (Figura 33, Tabla 9).

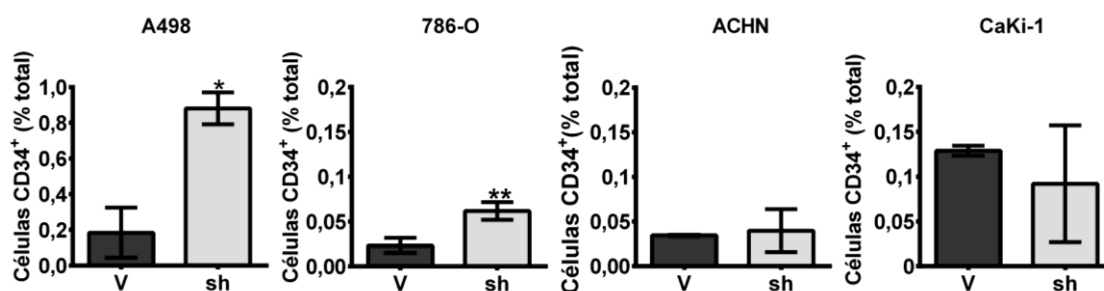


Figura 33. Efecto de la disminución de los niveles de MYBBP1A en el porcentaje de células CD34⁺ de las líneas celulares de carcinoma de células renales. Se cuantificó el porcentaje de células CD34⁺ de cada línea celular por citometría de flujo. Se muestra la media del porcentaje de células CD34⁺ de las células control (V) y las células con niveles bajos de MYBBP1A (sh) de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con el test t-student (*p<0,05; **p<0,01).

Tabla 9. Porcentaje de células CD34⁺ de cada línea celular.

Línea celular		Células CD34 ⁺ (% total)	Valor p
A498	V	0,296	0,0276 (*)
	sh	0,881	
786-O	V	0,023	0,003 (**)
	sh	0,062	
ACHN	V	0,035	0,793
	sh	0,040	
CaKi-1	V	0,129	0,507
	sh	0,092	

Se muestra la media del porcentaje de células CD34⁺ de cada línea celular y el resultado del test estadístico t-student aplicado para comparar la media del porcentaje de células CD34⁺ de las células control y de las células con niveles bajos de MYBBP1A en cada línea celular.

Finalmente, como las líneas celulares que presentaban niveles altos de c-MYB no expresaban pVHL, estudiamos la relevancia de pVHL en el fenotipo asociado a la reducción de los niveles de MYBBP1A. En primer lugar analizamos la correlación entre la expresión de *MYBBP1A*, *c-MYB* y *VHL* en la base de datos transcriptómicos pública Dykema-Kort, que contiene muestras renales de tejido normal y tumoral. En esta base de datos no existía ninguna correlación entre la expresión de *VHL* y la expresión de *MYBBP1A* o *c-MYB* en las muestras de tejido normal, sin embargo en las muestras de tejido tumoral tanto *MYBBP1A* como *c-MYB* mostraban una tendencia de correlación negativa con *VHL* ($r=-0,27$ y $r=-0,19$), sugiriendo una posible relación negativa entre *VHL* y *c-MYB* y entre *VHL* y *MYBBP1A* (Figura 34A y 34B). En base a esta observación, sobreexpresamos el ADNc de *VHL* en la línea 786-O control y en la línea

786-O con niveles reducidos de MYBBP1A y realizamos un ensayo de clonabilidad con el fin de analizar el efecto de pVHL en la capacidad de formación de colonias de las dos líneas celulares. En ambos casos VHL actúa como un gen supresor de tumores, ya que la sobreexpresión de VHL disminuye el número de colonias formadas por las dos líneas celulares, aunque el efecto era más pronunciado en la línea 786-O con bajo MYBBP1A (Figura 34C). Sin embargo, la expresión de pVHL no inducía cambios significativos en la expresión de c-MYB ni en la expresión de MYBBP1A (Figura 34D).

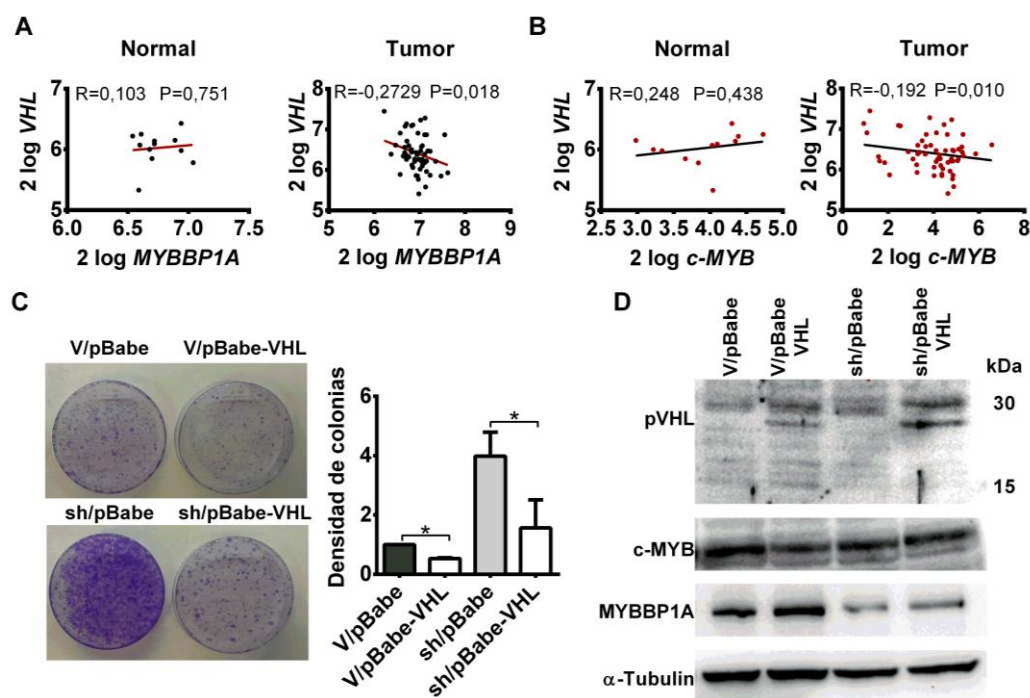


Figura 34. Papel de pVHL en el fenotipo asociado a la reducción de MYBBP1A. (A) Análisis de correlación de la expresión de VHL y MYBBP1A en la base de datos Dykema-Kort. Se muestran las gráficas de dispersión de la expresión de VHL frente a MYBBP1A en las muestras normales (izquierda) y tumorales (derecha). **(B) Análisis de correlación de la expresión de VHL y c-MYB en la base de datos Dykema-Kort.** Se muestran las gráficas de dispersión de la expresión de VHL frente a c-MYB en las muestras normales (izquierda) y tumorales (derecha). **(A) y (B)** Se realizó el análisis estadístico con el coeficiente de correlación de Pearson. **(C) Ensayo de clonabilidad en las líneas 786-O control (V) y 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A (sh) tras la sobreexpresión de VHL.** Se transfectaron las líneas 786-O control (V) y 786-O con bajo MYBBP1A (sh) con el ADNc de VHL (pBabe-VHL) y su respectivo vector vacío (pBabe) y se cuantificó el número de colonias formadas a los 15 días de la transfección. El análisis estadístico se realizó con el test t-student (* $p < 0,05$). **(D) Efecto de la sobreexpresión de la isoforma 1 de pVHL en los niveles de MYBBP1A y c-MYB.** Se midieron los niveles de pVHL, c-MYB y MYBBP1A en las líneas 786-O control (V) y 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A (sh) transfectadas con el ADNc de VHL (pBabe-VHL) y su respectivo vector vacío (pBabe) por WB.

4. Activación de PGC-1 α por reducción de los niveles de MYBBP1A

Se ha descrito previamente la relación directa entre MYBBP1A y PGC-1 α , que consiste en la unión y represión de MYBBP1A a PGC-1 α ⁵⁰. Esta unión se impide a través de la fosforilación de PGC-1 α por la quinasa p38⁵⁰. Para estudiar esta relación

en nuestro modelo, analizamos en primer lugar la unión entre MYBBP1A y PGC-1 α a distintas concentraciones de glucosa mediante el ensayo de co-inmunoprecipitación. Para ello, inmunoprecipitamos MYBBP1A en la línea 786-O con bajo MYBBP1A y en la línea control y evaluamos la presencia o ausencia de PGC-1 α . Observamos la co-inmunoprecipitación de MYBBP1A y PGC-1 α en la línea control (V) tanto a glucosa alta como baja, puesto que detectamos la banda de PGC-1 α de mayor intensidad en la fracción del extracto de proteínas correspondiente a la inmunoprecipitación de MYBBP1A y la banda de menor intensidad en el sobrenadante, que se corresponde con el resto del extracto de proteínas de la célula (Figura 35A). Sin embargo en la línea 786-O con niveles bajos de MYBBP1A (sh) observamos el perfil contrario, la banda de PGC-1 α de mayor intensidad fue detectada en el sobrenadante, indicando que al haber menor cantidad de MYBBP1A en la célula se reduce la unión de MYBBP1A a PGC-1 α (Figura 35A). A continuación, analizamos los niveles de PGC-1 α , SGLT1, diana transcripcional de PGC-1 α , p38 y de la fosforilación de p38 en los residuos Thr180/Tyr182 por western blot. Observamos un aumento de los niveles de PGC-1 α y un incremento del peso molecular de la banda correspondiente a PGC-1 α , debido a la fosforilación de la proteína, en las líneas A498 y 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A en comparación con las células control. También encontramos un aumento de la fosforilación de p38 y de los niveles de expresión de SGLT1 en estas células (Figura 35B). En cambio, no observamos variaciones significativas en los niveles de estas proteínas en las líneas ACHN y CaKi-1 (Figura 35B).

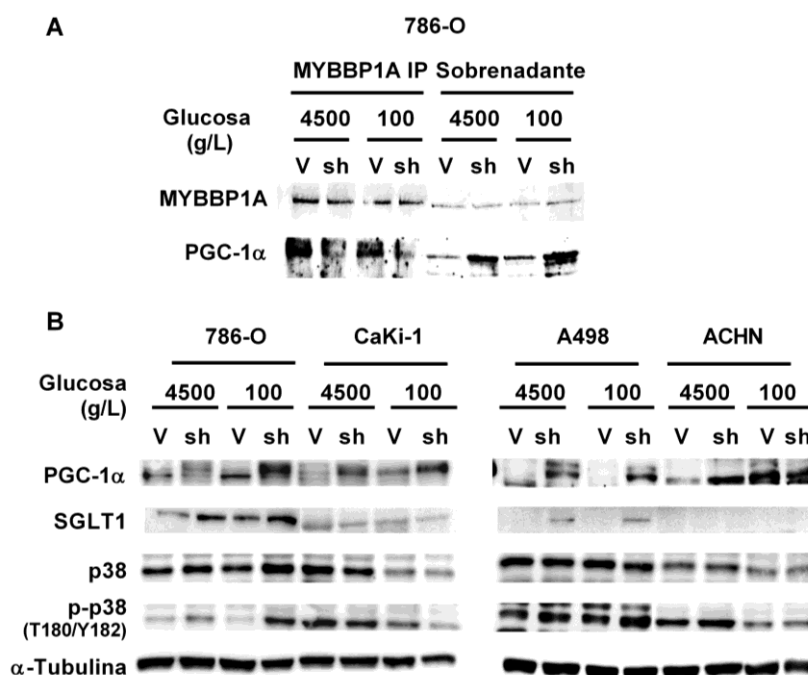


Figura 35. La reducción de los niveles de MYBBP1A induce la activación de PGC-1 α . (A) Ensayo de co-inmunoprecipitación de MYBBP1A y PGC-1 α a glucosa alta (4500 mg/L) y baja (100 mg/L). Se inmunoprecipitó MYBBP1A y se analizó la co-inmunoprecipitación de PGC-1 α en la línea 786-O control (V) y en la línea 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A (sh). (B) Valoración de la activación de PGC-1 α por reducción de MYBBP1A. Se midieron los niveles de PGC-1 α , SGLT1, p38 y de la fosforilación de p38 (T180/Y182) en las células control (V) y en las células con niveles reducidos de MYBBP1A (sh) por WB.

El aumento de los niveles de PGC-1 α , SGLT1 y de la fosforilación de p38 indican un aumento de la actividad de PGC-1 α . Para confirmar la activación de PGC-1 α , medimos los niveles de expresión de *GLUT4* y *SGLT1*, dos dianas transcripcionales de PGC-1 α ^{105,106}. Observamos el aumento de los niveles de ARNm de estos dos genes en las líneas A498 y 786-O con niveles bajos de MYBBP1A en comparación con las líneas control, pero no encontramos diferencias en las líneas ACHN y CaKi-1 (Figura 36A). Al observar que este aumento se producía únicamente en las líneas celulares que expresan c-MYB, decidimos analizar si la reducción de MYBBP1A participaba de forma indirecta en la activación de PGC-1 α por activación de c-MYB. Con este fin sobreexpresamos *c-MYB* en la línea CaKi-1 y medimos los niveles de expresión del ARNm de *PGC-1 α* , *GLUT4*, diana transcripcional de PGC-1 α , y *CXCR4*, gen diana de c-MYB como control de la actividad transcripcional de c-MYB. Observamos un aumento de los niveles de ARNm de *PGC-1 α* , *GLUT4* y *CXCR4* al sobreexpresar *c-MYB* (Figura 36B). También observamos un aumento similar de la expresión del ARNm de PGC-1 α en las líneas celulares c-MYB⁺ A498 y 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A (Figura 36C). A continuación, para estudiar en mayor profundidad el papel de c-MYB en la inducción de la transcripción de *PGC-1 α* , realizamos una búsqueda de secuencias de unión de c-MYB en el promotor de *PGC-1 α* . Para ello, realizamos un estudio predictivo en la base de datos JASPAR, identificando seis posibles sitios de unión de c-MYB en el promotor de *PGC-1 α* . Uno de estos sitios de unión presentaba una puntuación superior a 10 (13,203), la cual indica una alta probabilidad de unión de c-MYB a esta secuencia (Figura 36D).

Por otro lado, se ha descrito que la activación de PGC-1 α reduce la expresión de los genes de las enzimas de la glucólisis en melanoma¹⁰⁷, de modo que medimos la expresión de los genes de la glucólisis en condiciones limitantes de glucosa (100 mg/L) en nuestras líneas celulares. Observamos que la reducción de MYBBP1A induce la reducción de la expresión de estos genes, especialmente de *HK2*, *PGAM1*, *PGK1* y *PKM*, pero únicamente en las líneas A498 y 786-O, las cuales expresan c-MYB (Figura 37A y 37B). Confirmamos la reducción de la expresión de *HK2* en la línea 786-O transfectada con el segundo shARN contra MYBBP1A (Figura 37C). En las líneas ACHN y CaKi-1 no solo no observamos la disminución de la expresión de estos genes, sino un aumento en la expresión de algunos genes en las células con niveles reducidos de MYBBP1A en comparación con las células control (Figura 37D y 37E).

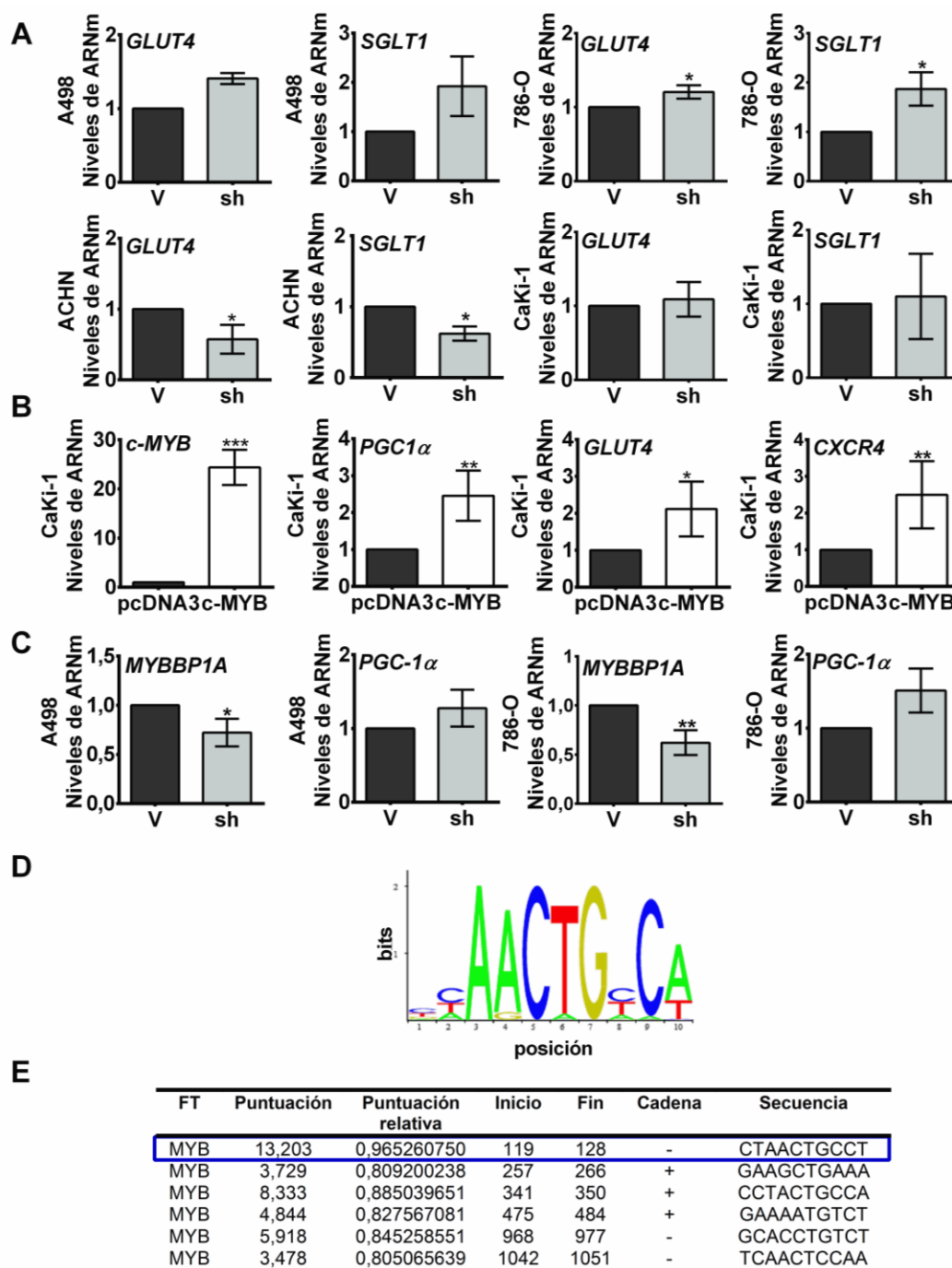


Figura 36. c-MYB regula la transcripción de *PGC-1α*. (A) Cuantificación de la expresión de los genes diana de *PGC-1α* *GLUT4* y *SGLT1* en condiciones limitantes de glucosa (100 mg/L) por RT-qPCR. (B) Validación de la sobreexpresión de *c-MYB* y cuantificación de los niveles de expresión de *PGC-1α*, *GLUT4* y *CXCR4* por RT-qPCR. (C) Validación de la reducción de la expresión de *MYBBP1A* y cuantificación de los niveles de *PGC-1α* por RT-qPCR. (A-C) Se representan gráficamente los niveles de ARNm de cada gen en relación a la expresión de las células control (V/pcDNA3). Todas las PCR se realizaron un mínimo de tres veces en triplicado con ARNm procedente de extractos distintos. El análisis estadístico se realizó con el test t-student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). (D) Se muestra la secuencia de reconocimiento del factor de transcripción c-MYB y las posibles bases nitrogenadas en cada posición (imagen procedente de la base de datos JASPAR). (E) Tabla que muestra el resultado del estudio predictivo de la posible unión de c-MYB al promotor de *PGC-1α* realizado en la base de datos JASPAR.

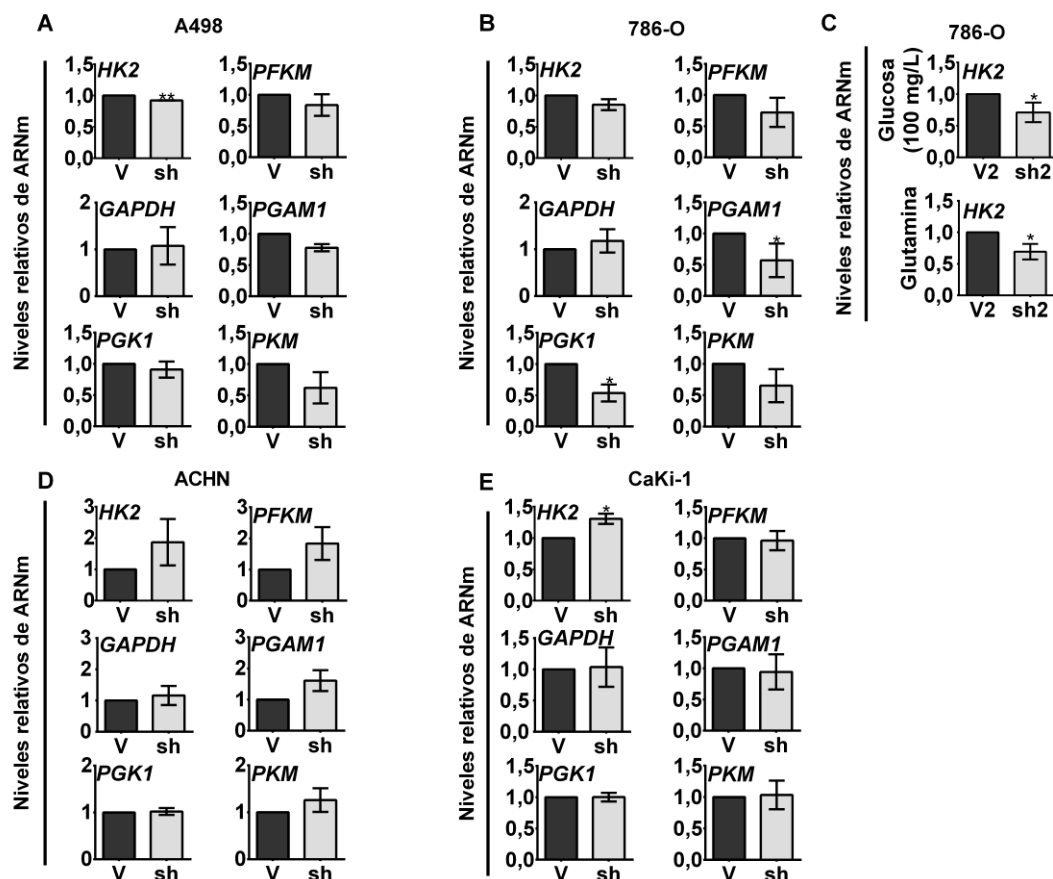


Figura 37. Efecto de la reducción de MYBBP1A en la expresión de los genes que codifican para las enzimas de la glucólisis. (A) (B) (D) y (E) Cuantificación de la expresión de los genes de la glucólisis en condiciones limitantes de glucosa (100 mg/L) por RT-qPCR. Se representan gráficamente los niveles de ARNm de cada gen en las células con niveles reducidos de MYBBP1A (sh) en relación a la expresión de las células control (V) (C) Cuantificación de la expresión de *HK2* en la línea 786-O en medio con glucosa baja (100 mg/L) y en medio con glutamina y sin glucosa por RT-qPCR. Se representan gráficamente los niveles de ARNm de *HK2* en las células con niveles reducidos de MYBBP1A (sh2) en relación a la expresión de las células control (V2). Todas las PCR se realizaron un mínimo de tres veces en triplicado con ARNm procedente de extractos distintos. El análisis estadístico se realizó con el test t-student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$).**

Por último, redujimos la expresión de *PGC-1 α* con el fin de comprobar si la actividad de *PGC-1 α* afectaba a los niveles de expresión de *c-MYB*, existiendo una regulación bidireccional entre estos dos reguladores de transcripción. Para ello, transfectamos la línea 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A con un shARN contra *PGC-1 α* o con su respectivo vector “scramble”. Tras validar que el shARN frente a *MYBBP1A* continuaba ejerciendo su función después de la segunda transfección (Figura 38A), y que el shARN frente a *PGC-1 α* disminuía los niveles de *PGC-1 α* (Figura 38B), medimos los niveles de expresión de *c-MYB*, observando que la disminución de *PGC-1 α* no afectaba a los niveles de expresión de *c-MYB* (Figura 38C).

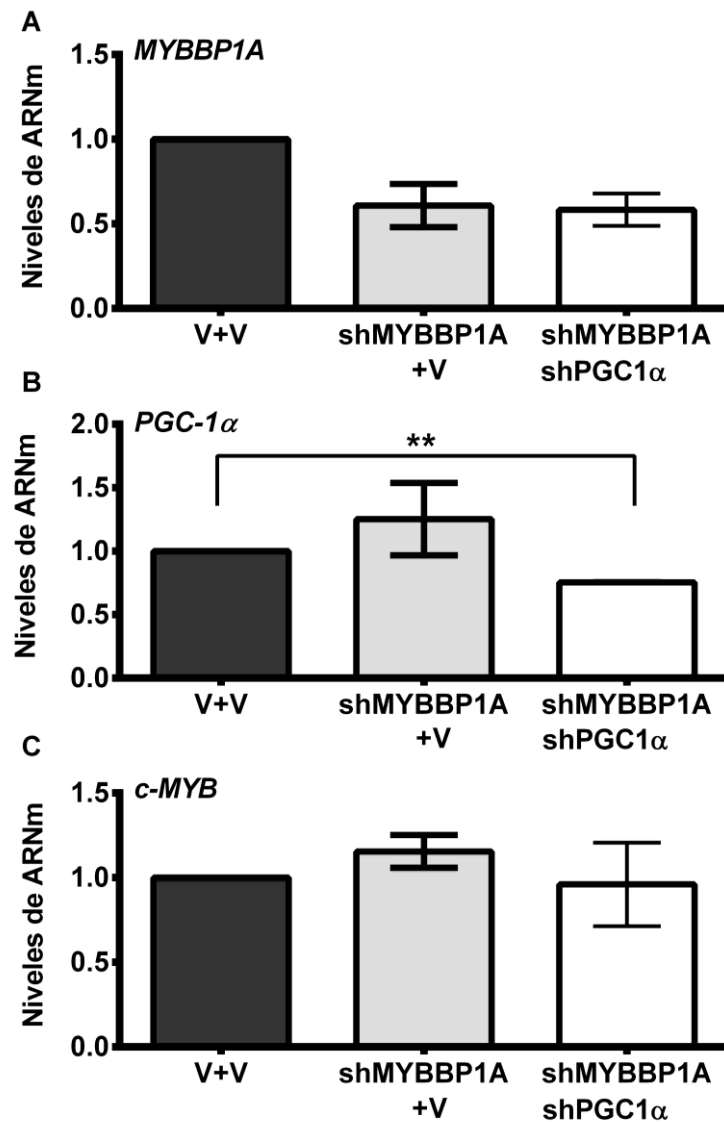


Figura 38. La reducción de los niveles de *PGC-1α* no afecta a la expresión de *c-MYB*. (A) Validación del efecto del shARN frente a *MYBBP1A* por RT-qPCR. Se representan gráficamente los niveles de ARNm de *MYBBP1A* en la línea 786-O control transfectada con el vector “*scramble*” (V), en la línea 786-O transfectada con el shARN frente a *MYBBP1A* y el vector “*scramble*” (shMYBBP1A) y en la línea 786-O transfectada con el shARN frente a *MYBBP1A* y el shARN frente a *PGC-1α* (shMYBBP1A shPGC1α), tomando como referencia la expresión de la línea control. **(B) Validación del efecto del shARN frente a *PGC-1α* por RT-qPCR.** Se representan gráficamente los niveles de ARNm de *PGC-1α* en las tres líneas celulares tomando como referencia la expresión de la línea control (V). **(C) Cuantificación de los niveles de expresión de *c-MYB* por RT-qPCR.** Se representan gráficamente los niveles de ARNm de *c-MYB* en las tres líneas celulares tomando como referencia la expresión de la línea control (V). Todos los genes se midieron por RT-qPCR un mínimo de tres veces en triplicado con ARNm procedente de extractos distintos. El análisis estadístico se realizó con el test t-student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

En conjunto, nuestros datos muestran que la reducción de MYBBP1A induce la activación de PGC-1α dualmente, de forma directa disminuyendo la unión y represión a PGC-1α, y de forma indirecta a través de c-MYB. Además, la activación de PGC-1α conduce a la represión de la glucólisis en las líneas c-MYB⁺ A498 y 786-O. Sin embargo, la reducción de PGC-1α no altera los niveles de expresión de c-MYB.

5. Plasticidad metabólica de células con niveles reducidos de MYBBP1A

La plasticidad metabólica consiste en la capacidad de las células en utilizar unas rutas metabólicas u otras en función de las necesidades de la célula y de la disponibilidad de nutrientes. MYBBP1A se aisló en un rastreo genético por pérdida de función en ausencia de glucosa, indicando que su pérdida facilita la adaptación de las células a la ausencia de glucosa. En base a este hecho y a que habíamos observado en nuestro modelo que las células con niveles bajos de MYBBP1A reducían la expresión de los genes de la glucólisis en condiciones limitantes de glucosa, analizamos las rutas metabólicas activadas en las células control y en las células con bajo MYBBP1A a distintas concentraciones de glucosa. Para ello, cultivamos la línea 786-O control y la línea 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A en medio con glucosa alta (4500 mg/L) y baja (100 mg/L) y realizamos una PCR con matrices de genes prediseñadas, que incluían sondas para 96 genes pertenecientes a distintas rutas de señalización del metabolismo de la glucosa. Utilizamos la línea 786-O para este experimento porque es una línea que se usa frecuentemente en ensayos de metabolismo y porque era la línea con mayor tasa de crecimiento en las curvas de crecimiento realizadas a glucosa baja. Al comparar la expresión de las células con bajo MYBBP1A con las células control a concentración de glucosa alta, observamos el aumento de la expresión de varios genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (*CS*, *PC*, *IDH2*, *MDH2*, *SUCLA2*, *SUCLG1*, *SUCLG2*) y de algunos genes implicados en la gluconeogénesis y en la ruta de las pentosas fosfato (Figura 39B). En cambio observamos la disminución de la expresión de dos genes de la glucólisis (*HK3*, *GPI*) (Figura 39B). Por otro lado, a glucosa baja encontramos el aumento de la expresión de varios genes involucrados en la gluconeogénesis (*FBP1*, *G6PC*, *GYS2*, *PCK1*, *GCK*, *PYGM*) (Figura 41B), proceso regulado también por PGC-1 α ¹⁰⁸. Finalmente, al comparar las diferencias de expresión entre las células con bajo MYBBP1A y las células control comunes en ambas concentraciones de glucosa, observamos el aumento de la expresión de *GALM* y *GYS2*, enzimas implicadas en el metabolismo de la galactosa y del glucógeno respectivamente, y la disminución de la expresión de *GPI*, enzima que cataliza el segundo paso de la glucólisis, tanto a glucosa alta como baja (Figura 39C). Estos resultados confirman nuestros datos anteriores en relación a la represión de los genes de la glucólisis al reducir los niveles de MYBBP1A y sugieren el aumento del metabolismo oxidativo y de la gluconeogénesis.

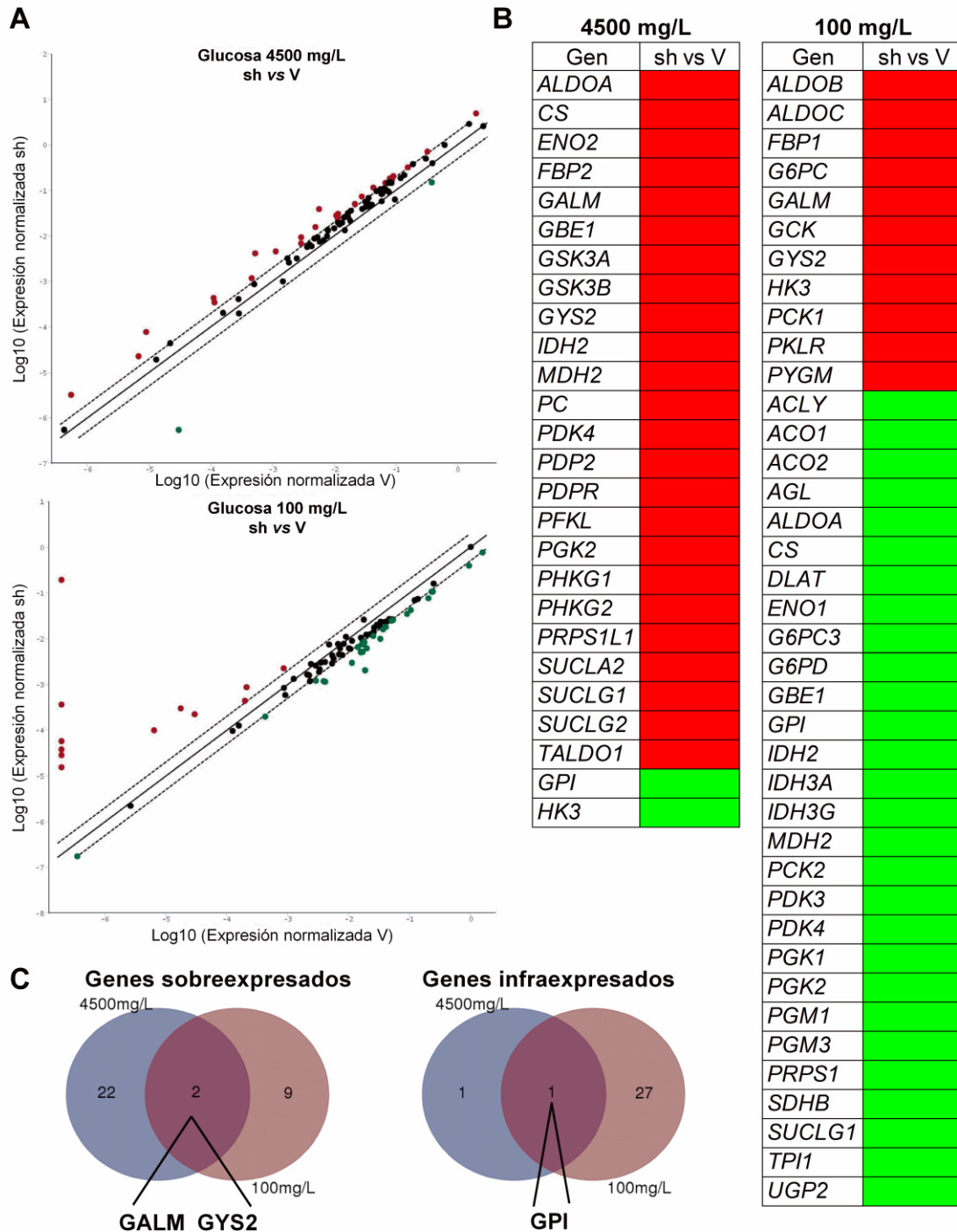


Figura 39. PCR array de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa en las líneas 786-O control y 786-O con bajo MYBBP1A a glucosa alta y baja. (A) Diagramas de dispersión en los que se representan en rojo los genes sobreexpresados, en verde los genes infraexpresados y en negro los genes sin diferencias de expresión en las células con niveles reducidos de MYBBP1A (sh) con respecto a las células control (V). (B) Tablas en las que se especifican los genes sobreexpresados (rojo) e infraexpresados (verde) en la línea 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A (sh) frente a la línea control (V). (C) A la izquierda se representa el diagrama de Venn de los genes sobreexpresados y a la derecha el diagrama de Venn de los genes infraexpresados en la línea con bajo MYBBP1A frente a la línea control tanto a glucosa alta (4500 mg/L) como baja (100 mg/L).

A continuación, evaluamos la capacidad de adaptación de las células con niveles reducidos de MYBBP1A a distintas condiciones de limitación de nutrientes. Cuando cultivamos las líneas 786-O control (V) y 786-O con bajo MYBBP1A (sh) en medio con glutamina y sin glucosa, observamos que las células control no crecían mientras que las células con bajo MYBBP1A crecían rápido (Figura 40A), indicando la reprogramación metabólica a OXPHOS. Encontramos un efecto similar cuando cultivamos las células a baja concentración de glucosa (100 mg/L) y sin glutamina, aunque en esta ocasión las células control mostraban cierto crecimiento al usar la glucosa como fuente de carbono (Figura 40B). La diferencia entre ambas líneas celulares era más evidente cuando cultivamos las células en medio con glutamina y con glucosa baja, presentando las células con bajo MYBBP1A una tasa de proliferación 4 veces mayor que las células control (Figura 40C). Sin embargo en hipoxia, cuando la ventaja que proporciona el oxígeno a las células que basan su metabolismo en OXPHOS desaparece, no existen diferencias en el crecimiento entre las dos líneas celulares (Figura 40D). Observamos resultados similares cuando cultivamos las células transfectadas con el segundo sh en estas condiciones (Figura 40E-F).

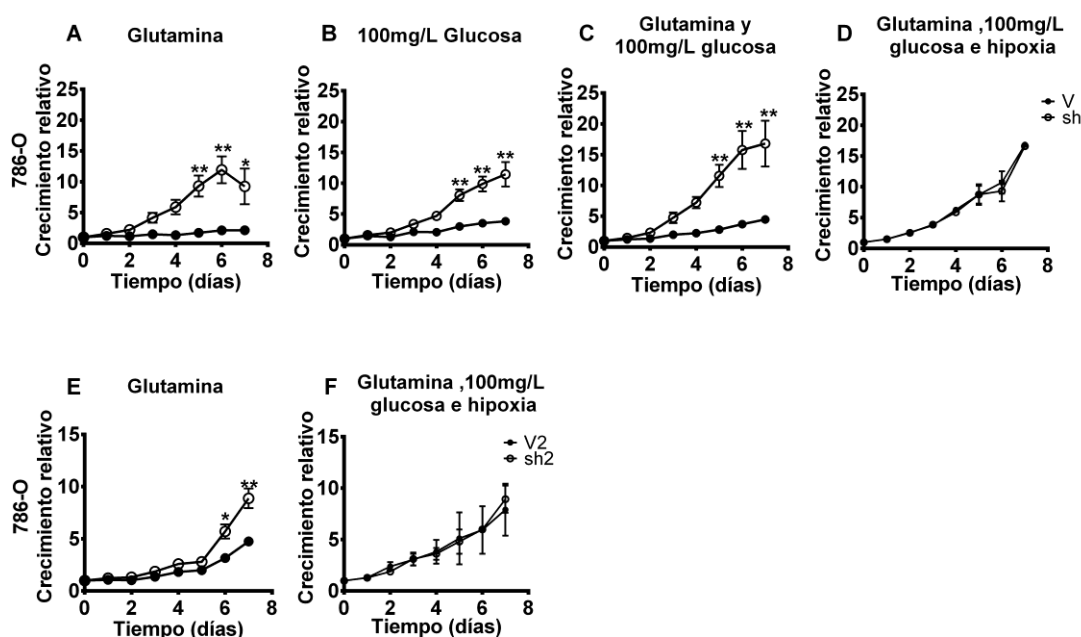


Figura 40. La reducción de MYBBP1A induce la reprogramación metabólica a OXPHOS en la línea 786-O. (A) Ensayo de curva de crecimiento en medio con glutamina y sin glucosa en normoxia. (B) Curva de crecimiento en medio con glucosa (100 mg/L) y sin glutamina en normoxia. (C) Curva de crecimiento en medio con glutamina y glucosa (100 mg/L) en normoxia. (D) Curva de crecimiento en medio con glutamina y glucosa (100 mg/L) en hipoxia (5%). (E) Curva de crecimiento en medio con glutamina y sin glucosa en normoxia (sh2). (F) Curva de crecimiento en medio con glutamina y glucosa (100 mg/L) en hipoxia (5%) (sh2). Todos los ensayos se realizaron tres veces por triplicado. Se representa la media \pm SD. El análisis estadístico se realizó con el test t-student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Para analizar la contribución de la vía de OXPHOS al metabolismo celular en mayor profundidad medimos la sensibilidad de la línea 786-O control y de la línea 786-O con niveles reducidos de MYBBP1A a rotenona, compuesto que inhibe la actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria¹⁰⁹. La rotenona es un compuesto muy tóxico para las células, pero es igual de tóxico para las células control y las células con bajo MYBBP1A en medio con glutamina y sin glucosa, tanto en normoxia (Figura 41A) como en hipoxia (Figura 41B). Sin embargo, cuando cultivamos las células en medio con glucosa baja y sin glutamina en normoxia, las células con bajo MYBBP1A presentan mayor sensibilidad a rotenona que las células control (Figura 41C). En cambio, en hipoxia esta diferencia desaparece, ya que la ausencia de oxígeno impide la reprogramación metabólica a OXPHOS (Figura 41D). Encontramos resultados similares cuando analizamos la sensibilidad a rotenona en la línea 786-O transfectada con el segundo shARN contra MYBBP1A (Figura 41E-H).

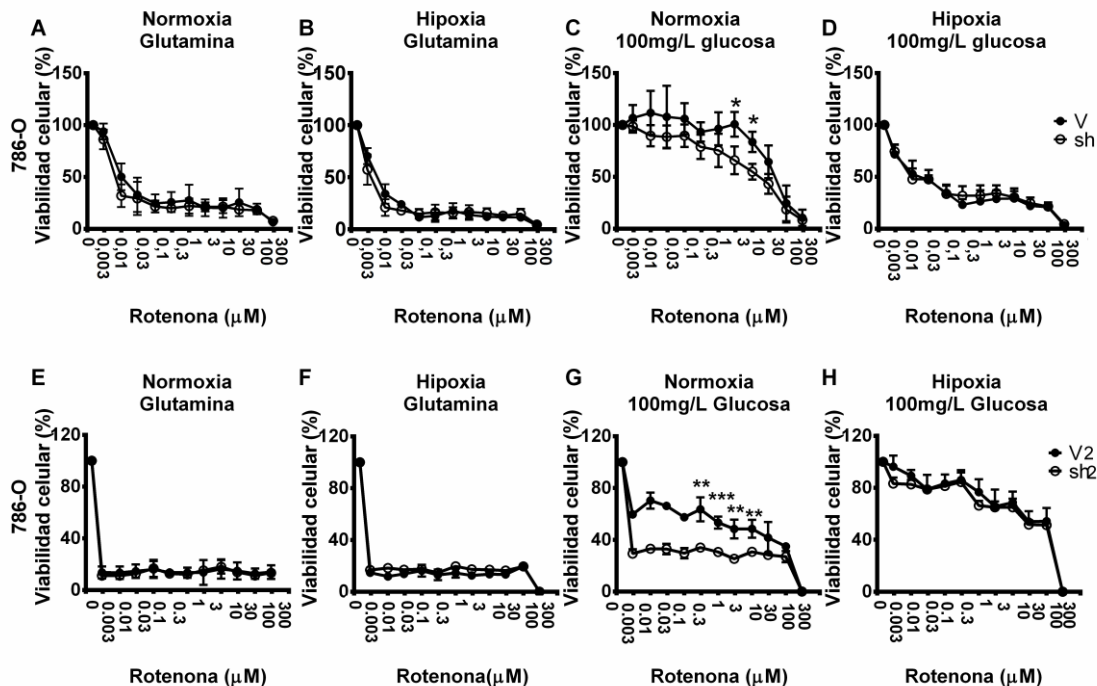


Figura 41. Efecto de la reducción de MYBBP1A en la sensibilidad a rotenona en la línea 786-O. (A) Ensayo de sensibilidad a rotenona en medio con glutamina y sin glucosa en normoxia. (B) Ensayo de sensibilidad a rotenona en medio con glutamina y sin glucosa en hipoxia (5%). (C) Ensayo de sensibilidad a rotenona en medio con glucosa (100 mg/L) y sin glutamina en normoxia. (D) Ensayo de sensibilidad a rotenona en medio con glucosa (100 mg/L) y sin glutamina en hipoxia. (E) Ensayo de sensibilidad a rotenona en medio con glutamina y sin glucosa en normoxia (sh2). (F) Ensayo de sensibilidad a rotenona en medio con glutamina y sin glucosa en hipoxia (5%) (sh2). (G) Ensayo de sensibilidad a rotenona en medio con glucosa (100 mg/L) y sin glutamina en normoxia (sh). (H) Ensayo de sensibilidad a rotenona en medio con glucosa (100 mg/L) y sin glutamina en hipoxia (sh2). Se representa la media \pm SD de cada ensayo. El análisis estadístico se realizó con el test t-student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Para corroborar la reprogramación metabólica a OXPHOS con otra aproximación experimental cuantificamos la producción de ROS mitocondrial, puesto que uno de

los productos de la fosforilación oxidativa es la formación de superóxido en la mitocondria. Con esta finalidad, cultivamos las células control y las células con bajo MYBBP1A de las líneas 786-O (c-MYB⁺ y pVHL⁻) y ACHN (c-MYB⁻ y pVHL⁺) en medio con glucosa alta, medio con glucosa baja y medio con glutamina y cuantificamos los niveles de ROS mitocondrial en cada condición por citometría de flujo. Observamos un aumento significativo en la producción de ROS mitocondrial en la línea 786-O con bajo MYBBP1A con respecto a la línea control en medio con glutamina y sin glucosa, pero no encontramos diferencias en ninguna condición en la línea ACHN (Figura 42), indicando que la reducción de MYBBP1A induce el cambio metabólico a OXPHOS en ausencia de glucosa solamente en la línea c-MYB⁺ 786-O.

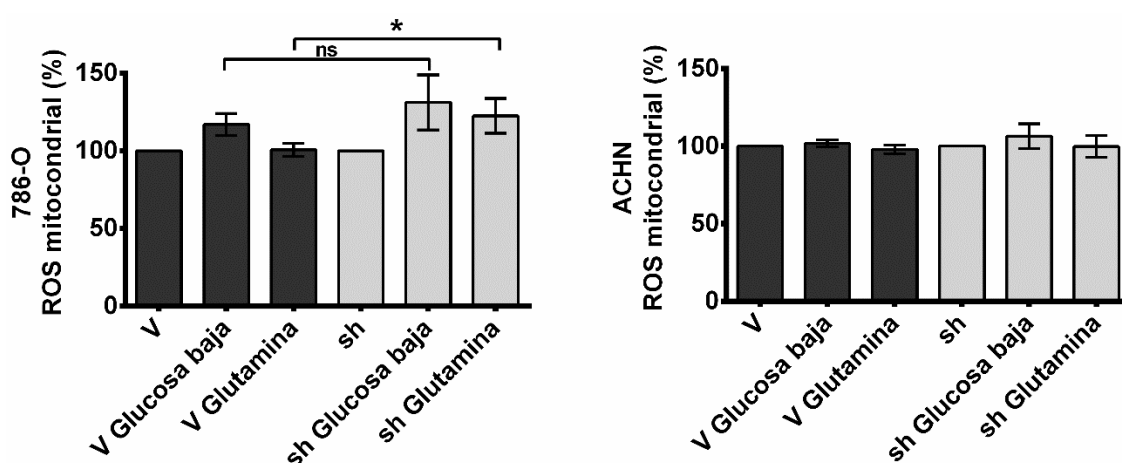


Figura 42. Efecto de la reducción de MYBBP1A en la producción de ROS mitocondrial. Se cultivaron las células control y las células con bajo MYBBP1A en medio completo, medio con glucosa baja (100 mg/L) y medio con glutamina. Se cuantificaron los niveles de ROS mitocondrial por tinción con mitoxox y análisis por citometría de flujo. Se midió la mediana de la intensidad de la señal de mitoxox en cada condición. Se muestran los niveles de ROS mitocondrial en medio con glucosa baja y medio con glutamina en relación a la producción de ROS en medio completo en porcentaje. Se representa la media de 3 experimentos independientes \pm desviación típica. El análisis estadístico se realizó con el test t-student (* $p < 0,05$).

La reprogramación metabólica de glucólisis a OXPHOS debería traducirse en una mayor producción de ATP en la célula, al ser el ciclo de Krebs más eficiente desde el punto de vista energético, genera 36/38 moléculas de ATP por molécula de glucosa mientras que la glucólisis genera 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa consumida. Para confirmar esta hipótesis medimos la cantidad de ATP producida en nuestras células en condiciones limitantes de glucosa. En primer lugar medimos los niveles de ATP de las líneas 786-O control y 786-O con bajo MYBBP1A en distintas condiciones. Observamos una mayor producción de ATP en las células con bajo MYBBP1A cuando crecíamos las células en medio con glutamina y sin glucosa (Figura 43A), pero no observamos este incremento en medio con glucosa baja y sin glutamina

(Figura 43A), sugiriendo que estas células usan preferentemente la glutamina como fuente de producción de ATP. En cambio, cuando medimos el balance ATP/ADP en estas líneas observamos un ligero aumento en este balance en las células con bajo MYBBP1A en comparación con las células control en ambas condiciones, aunque el aumento era más claro cuando las células se encontraban en medio con glutamina (Figura 43B). Posteriormente medimos la producción de ATP en condiciones limitantes de glucosa en el resto de las líneas celulares. Observamos una mayor producción de ATP tanto en medio con glutamina y sin glucosa como en medio con glucosa baja y sin glutamina en la línea A498 con niveles reducidos de MYBBP1A, pero no en la línea ACHN (Figura 43C-D). En la línea CaKi-1 con niveles reducidos de MYBBP1A no aumentaban los niveles de ATP en medio con glucosa baja y sin glutamina, aunque sorprendentemente observamos una mayor producción de ATP en medio con glutamina, sugiriendo la activación de una ruta de degradación de la glutamina alternativa que no requiere la actividad de c-MYB (Figura 43E).

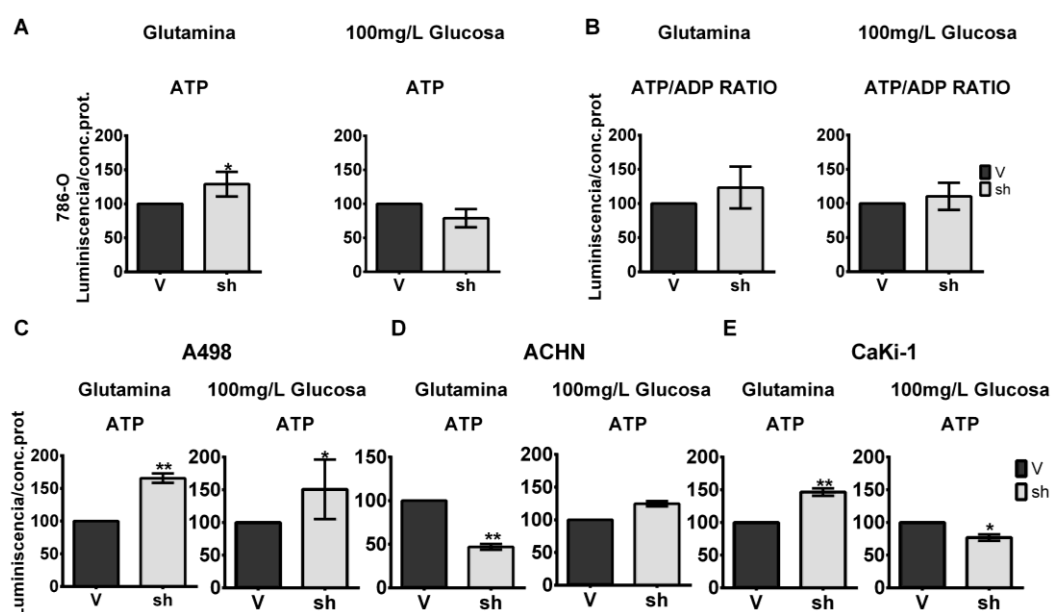


Figura 43. Efecto de la reducción de MYBBP1A en la producción de ATP celular. (A) Cuantificación de los niveles de ATP en la línea 786-O en medio con glutamina y sin glucosa y en medio sin glutamina y con glucosa baja (100 mg/L). Se cuantificaron los niveles de ATP en unidades de luminiscencia por concentración de proteína. Se representan los niveles de ATP de las células con MYBBP1A bajo en base a los niveles de ATP de las células control (100%). Se muestra la media de 3 experimentos realizados de forma independiente por triplicado. **(B) Cuantificación del balance ATP/ADP en la línea 786-O en medio con glutamina y sin glucosa y en medio sin glutamina y con glucosa baja (100 mg/L).** Se cuantificaron los niveles de ATP y ADP en unidades de luminiscencia por concentración de proteína. Se representa el balance ATP/ADP de las células con MYBBP1A bajo en base a los niveles de ATP de las células control (100%). Se muestra la media de 3 experimentos realizados de forma independiente por triplicado. **(C) (D) y (E) Cuantificación de los niveles de ATP celular en las líneas A498, ACHN y CaKi-1 en medio con glutamina y sin glucosa y en medio sin glutamina y con glucosa baja (100 mg/L).** Se cuantificaron los niveles de ATP en unidades de luminiscencia por concentración de proteína. Se representan los niveles de ATP de las células con MYBBP1A bajo en base a los niveles de ATP de las células control (100%). Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos realizados de forma independiente por triplicado. El análisis estadístico se realizó con el test t-student (*p<0,05; **p<0,01).

A continuación, caracterizamos el estado de las rutas LKB1-AMPK y mTOR en nuestro modelo, puesto que se ha descrito que son rutas metabólicas que integran las señales de crecimiento celular con la disponibilidad de nutrientes. Para ello, medimos los niveles de LKB1, AMPK, p-AMPK, mTOR, p-mTOR, S6 y p-S6, efector final de la ruta de mTOR, a glucosa alta y baja. No encontramos diferencias significativas en los niveles de LKB1, AMPK y p-AMPK entre las células control y las células con bajo MYBBP1A en ninguna de las líneas celulares, indicando que MYBBP1A no participa en la regulación de esta vía (Figura 44A). Sin embargo, observamos un aumento en la fosforilación de S6 en las células con bajo MYBBP1A en comparación con las células control en las líneas A498 y 786-O tanto a glucosa alta como baja, mostrando que la reducción de MYBBP1A conduce a la activación de la ruta de mTOR en células tumorales que expresan c-MYB y no expresan pVHL (Figura 44A).

Finalmente, tras haber observado que la reducción de MYBBP1A conduce al aumento de la vía de OXPHOS y a la disminución de la glucólisis, exploramos si la reducción de MYBBP1A aumentaba el proceso de autofagia, el cual puede actuar como fuente de precursores para la síntesis de macromoléculas. Con este fin, medimos los niveles de p62 y LC3B en nuestro modelo celular a glucosa alta y baja, pero no encontramos diferencias significativas en los niveles de estas proteínas entre las células con bajo MYBBP1A y las células control en ninguna de las líneas celulares (Figura 44B).

Nuestros datos indican que la pérdida de MYBBP1A proporciona mayor plasticidad metabólica a las células para adaptarse a condiciones en las que la concentración de glucosa es limitante, usando glutamina como fuente de carbono y ATP. Sin embargo, sólo las células que expresan c-MYB y no expresan pVHL son capaces de llevar a cabo la reprogramación metabólica de glucólisis a OXPHOS tras la reducción de los niveles de MYBBP1A.

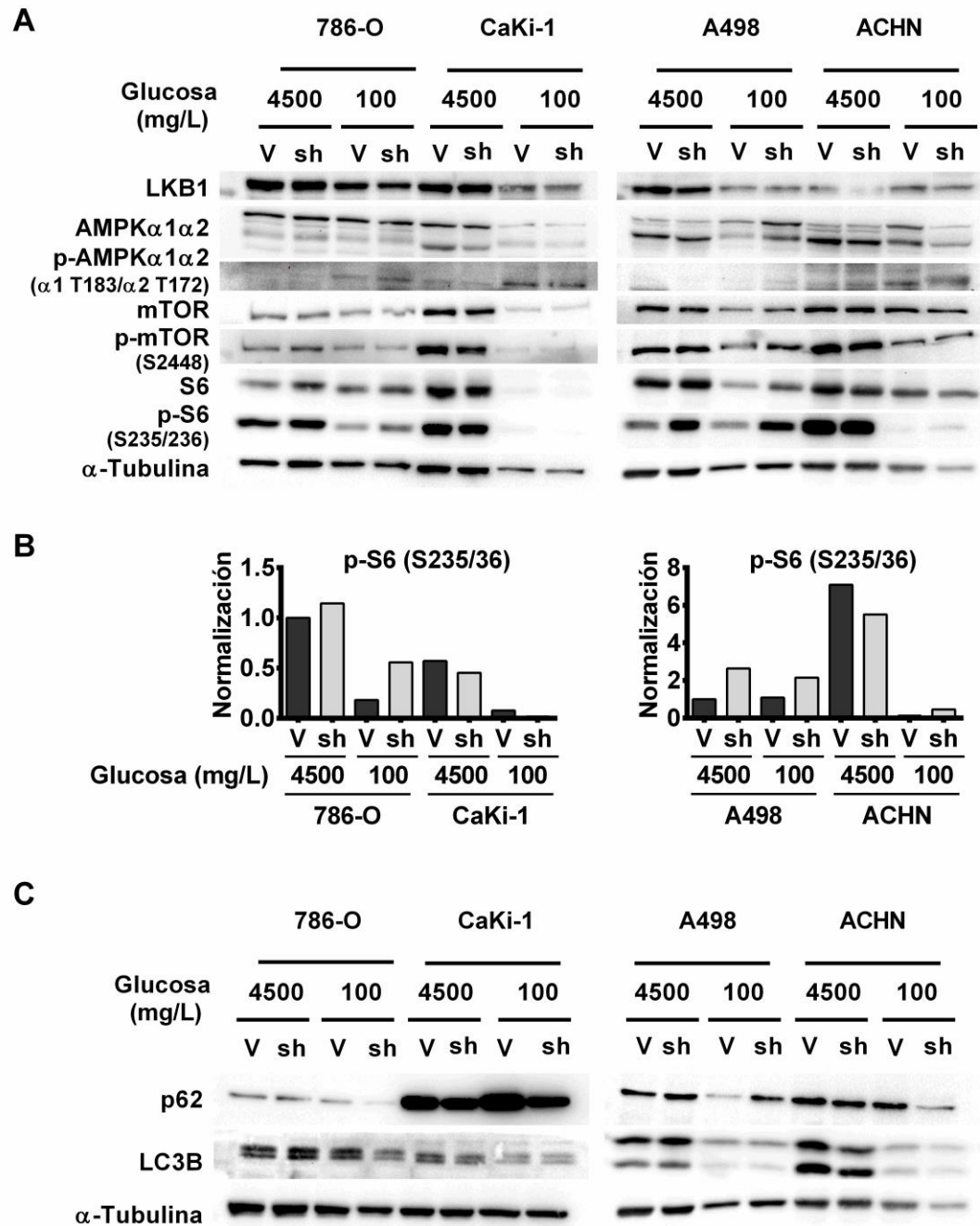


Figura 44. Efecto de la reducción de MYBBP1A en la regulación de rutas metabólicas y de la autofagia. (A) Efecto de la reducción de MYBBP1A en la activación de las rutas LKB1-AMPK y mTOR. Se midieron los niveles de LKB1, AMPK, p-AMPK, mTOR, p-mTOR, S6 y p-S6 en las células con MYBBP1A bajo (sh) y en las células control (V) de las 4 líneas celulares a glucosa alta (4500 mg/L) y baja (100 mg/L) por WB. **(B) Cuantificación de los niveles de p-S6.** Se muestra la normalización de los niveles de p-S6 (S235/236) utilizando α -Tubulina como control de carga. **(C) Efecto de la reducción de MYBBP1A en el proceso de autofagia.** Se midieron los niveles de p62 y LC3B en las células con MYBBP1A bajo (sh) y en las células control (V) de las 4 líneas celulares a glucosa alta (4500 mg/L) y baja (100 mg/L) por WB.

6. Análisis de expresión de MYBBP1A en bases de datos públicas de tumores renales

Nuestros datos sugerían que la pérdida de MYBBP1A induce el aumento de algunas propiedades tumorales en líneas celulares de carcinoma de células renales que expresan c-MYB. Además, la pérdida de MYBBP1A conduce al aumento de la actividad de c-MYB y PGC-1 α en las líneas celulares que no expresan pVHL. Para corroborar en tumores humanos el papel de MYBBP1A en el desarrollo tumoral observado en nuestro modelo celular, realizamos un análisis bioinformático con bases de datos transcriptómicas públicas y con la plataforma de visualización y análisis genómico R2. Analizamos 6 bases de datos de muestras de tumores renales para estudiar tanto los niveles de expresión de *MYBBP1A* como la correlación entre la expresión de *MYBBP1A* y genes de rutas de señalización involucradas en la iniciación y el desarrollo tumoral. Con el objetivo de simplificar el análisis agrupamos las bases de datos disponibles en 3 grupos: EXPO (contiene muestras tumorales de varios subtipos de carcinomas de células renales), TCGA (unión de 3 bases de datos, una base de datos de CCRcc, una base de datos de CCRp y una base de datos de CCRcr) y Dykema-Kort (unión de dos bases de datos que contienen muestras normales y tumorales de varios subtipos de carcinomas de células renales).

Analizamos los niveles de expresión de *MYBBP1A* en las bases de datos transcriptómicas de R2. Tanto en la base de datos Dykema-Kort como en la base de datos EXPO no encontramos diferencias significativas al comparar la media de la expresión de *MYBBP1A* del tejido normal y del tejido tumoral de la mayoría de subtipos, excepto en el subtipo de CCRp, que presentaba mayor expresión de *MYBBP1A* que el tejido normal. Sin embargo, en la base de datos EXPO observamos un grupo de muestras de CCRcr, CCRcc y CCRp con niveles de *MYBBP1A* más bajos que el tejido normal. (Figura 45A). Además, en la base de datos EXPO los valores de expresión de *MYBBP1A* más bajos se encontraban en estadios tumorales avanzados, en los estadios III y IV (Figura 45B). En la base de datos TCGA observamos resultados similares, la media de la expresión de *MYBBP1A* era mayor en el tejido tumoral que en el tejido normal, pero había un grupo de muestras de CCRcc que presentaban niveles de *MYBBP1A* más bajos que el tejido normal (Figura 45C).

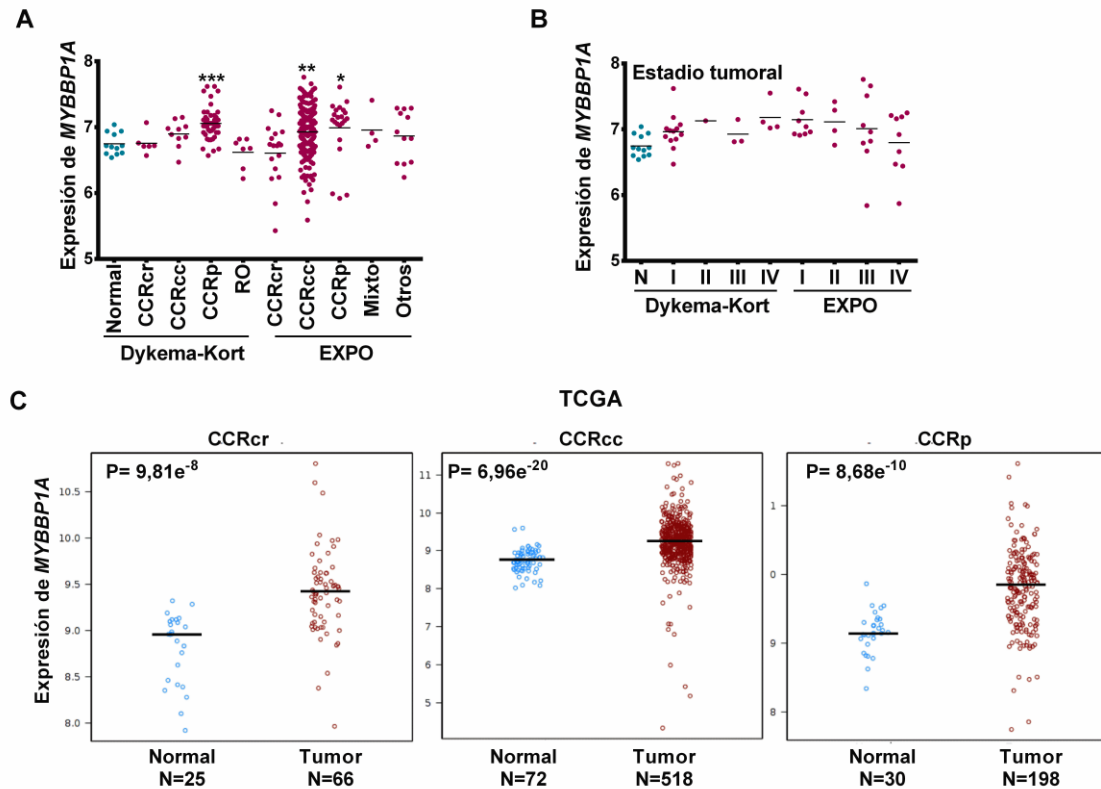


Figura 45. Niveles de expresión de MYBBP1A en tumores renales humanos. (A) Niveles de expresión de MYBBP1A en distintos subtipos de carcinomas de células renales. Se representan los niveles de expresión normalizados de MYBBP1A de las muestras de tejido normal y de los distintos subtipos de tumores renales de las bases de datos Dykema-Kort y EXPO. El análisis estadístico se realizó con el test t-student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). **(B) Niveles de expresión de MYBBP1A en distintos estadios de tumores renales.** Se representan los niveles de expresión normalizados de MYBBP1A de las muestras de tejido normal y de las muestras tumorales de las bases de datos Dykema-Kort y EXPO en función de los distintos estadios tumorales. **(C) Niveles de expresión de MYBBP1A en CCRcr, CCRcc y CCRp.** Se representan los niveles de expresión normalizados de MYBBP1A de las muestras de tejido normal y de los distintos subtipos de tumores renales de la base de datos TCGA. El análisis estadístico se realizó con el test de Wilcoxon. Datos procedentes de las plataformas R2 y MapLab.

Como habíamos encontrado una relación funcional entre MYBBP1A, c-MYB y PGC-1 α en las líneas de carcinoma renal que expresaban c-MYB y no expresaban pVHL, estudiamos si existía alguna correlación entre la expresión de estos genes. Para ello analizamos los coeficientes de correlación de Pearson para todas las posibles combinaciones de estos genes (MYBBP1A-c-MYB, MYBBP1A-VHL, c-MYB-VHL, MYBBP1A-PGC-1 α , pVHL-PGC-1 α , etc.) en todas las bases de datos. No encontramos correlaciones claras, la mayoría de los valores de los coeficientes de correlación de Pearson eran bajos y existía bastante variabilidad de unas bases de datos a otras. La ausencia de correlaciones concluyentes podría deberse a que las interacciones entre estos genes se producen fundamentalmente a nivel de proteína, no de ARNm.

6.1. Correlación de la expresión de *MYBBP1A* con genes de rutas de señalización reguladoras del fenotipo de célula madre

Los resultados obtenidos en nuestro modelo celular mostraban un aumento de las propiedades de las características de célula madre al reducir la expresión de *MYBBP1A* en las líneas celulares que expresaban c-MYB. Para examinar si este efecto se observaba en pacientes de cáncer de riñón, analizamos la correlación entre la expresión de *MYBBP1A* y la expresión de genes de rutas de señalización reguladoras del fenotipo de célula madre en las bases de datos disponibles en R2. Además, como habíamos observado en nuestro modelo celular que la reducción de los niveles de expresión de *MYBBP1A* inducía la activación de *PGC-1 α* , estudiamos también la correlación entre la expresión de *PGC-1 α* y los genes del fenotipo de célula madre. A continuación, analizamos qué genes implicados en la regulación del fenotipo de célula madre que correlacionaban negativamente con *MYBBP1A* coincidían con los genes que correlacionaban positivamente con *PGC-1 α* , puesto que serían genes cuya transcripción se induciría al reducirse la expresión de *MYBBP1A* y activarse *PGC-1 α* . Tras examinar los genes que cumplían esta condición en alguna de las 3 bases de datos de nuestro estudio identificamos 36 genes (Figura 46A). Con el fin de realizar un análisis más preciso, examinamos los genes implicados en la regulación del fenotipo de células madre que correlacionaban negativamente con la expresión de *MYBBP1A* y positivamente con *PGC-1 α* en al menos 2 de las 3 bases de datos de nuestro estudio. En esta ocasión obtuvimos una firma genética compuesta por 5 genes (*SMARCAD1*, *REST*, *SMAD4*, *SMAD2* y *PCGF5*) (Figura 46B). Finalmente, cuando analizamos la expresión de estos 5 genes, *MYBBP1A* y *PGC-1 α* mediante “*heatmaps*”, identificamos un grupo de muestras de pacientes con baja expresión de *MYBBP1A* y alta expresión de *PGC-1 α* , *SMARCAD1*, *REST*, *SMAD4*, *SMAD2* y *PCGF5* (Figura 46C). También encontramos un grupo de muestras con el patrón de expresión contrario, alta expresión de *MYBBP1A* y baja expresión de *PGC-1 α* , *SMARCAD1*, *REST*, *SMAD4*, *SMAD2* y *PCGF5* (Figura 46C). Para visualizar con mayor claridad la diferencia en la expresión de *PGC-1 α* , *SMARCAD1*, *REST*, *SMAD4*, *SMAD2* y *PCGF5* en función de los niveles de expresión de *MYBBP1A*, generamos un *heatmap* con el 6% de las muestras, entre las que se encontraban muestras con niveles bajos de *MYBBP1A* (3%) y muestras con niveles altos de *MYBBP1A* (3%). En esta selección de muestras con niveles de expresión de *MYBBP1A* contrarios se observa con mayor claridad los patrones de expresión contrapuestos de estos genes relacionados con el fenotipo de

célula madre (Figura 46D), indicando que su expresión varía en función de los niveles de MYBBP1A.

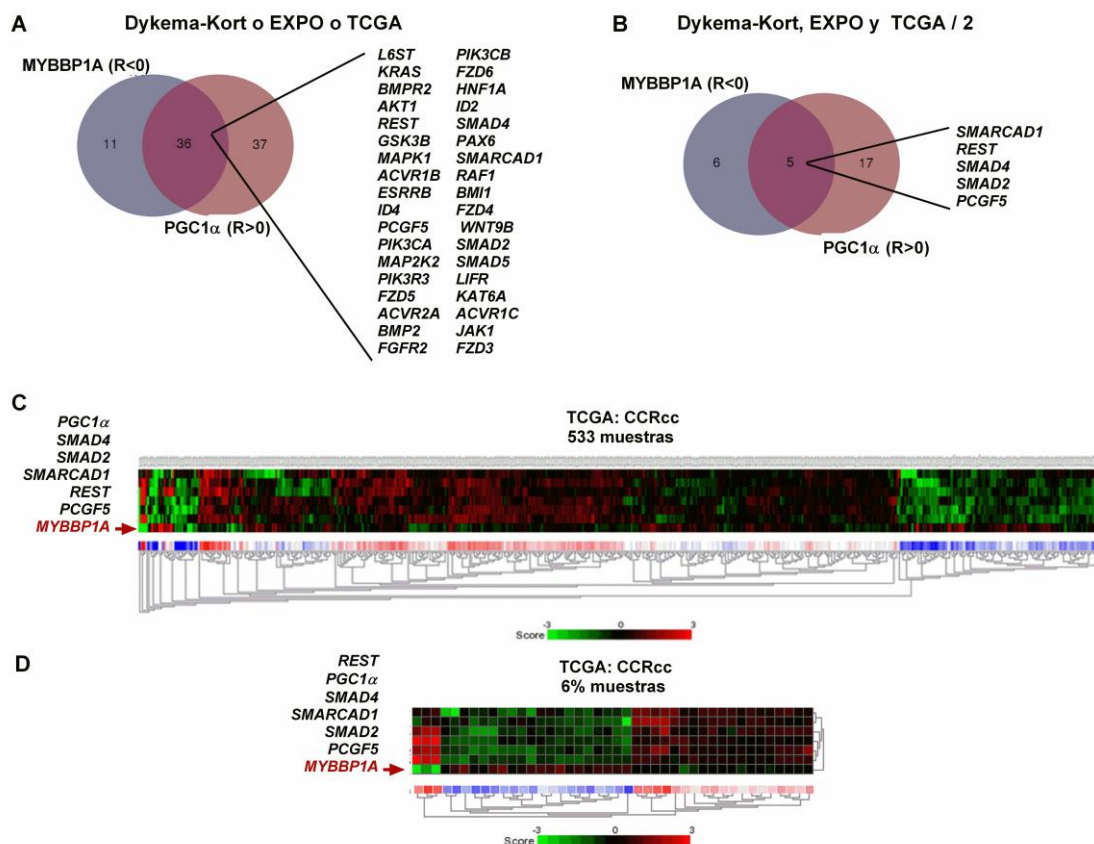


Figura 46. La expresión de *MYBBP1A* correlaciona negativamente con la expresión de *PGC-1α*, *SMARCAD1*, *REST*, *SMAD4*, *SMAD2* y *PCGF5* en muestras de pacientes de cáncer de riñón. **(A)** Diagrama de Venn de los genes reguladores del fenotipo de célula madre que correlacionan negativamente con *MYBBP1A* y positivamente con *PGC-1α* en alguna de las 3 bases de datos analizadas. **(B)** Diagrama de Venn de los genes reguladores del fenotipo de célula madre que correlacionan negativamente con *MYBBP1A* y positivamente con *PGC-1α* en al menos 2 de las 3 bases de datos analizadas. **(C)** Heatmap que muestra la expresión de los genes *MYBBP1A*, *PGC-1α*, *SMARCAD1*, *REST*, *SMAD4*, *SMAD2* y *PCGF5* en los pacientes con carcinoma renal de células claras de la base de datos TCGA **(D)** Heatmap que muestra la expresión de los genes *MYBBP1A*, *PGC-1α*, *SMARCAD1*, *REST*, *SMAD4*, *SMAD2* y *PCGF5* en el 6% de los pacientes con carcinoma renal de células claras de la base de datos TCGA (3% pacientes con *MYBBP1A* bajo y 3% pacientes con *MYBBP1A* alto). **(C)** y **(D)** La barra inferior muestra los niveles de expresión de los genes, el color verde indica baja expresión y el rojo alta expresión.

6.2. Efecto de la pérdida de *MYBBP1A* en la activación de *c-MYB* y su papel en la progresión tumoral

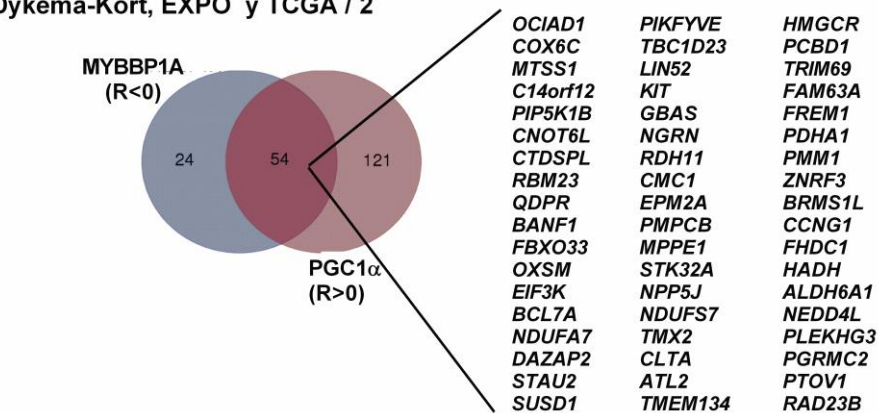
A continuación, estudiamos si la relación funcional observada entre *MYBBP1A* y *c-MYB* en nuestro modelo celular existía en muestras de pacientes de cáncer renal. Los resultados obtenidos en nuestro modelo celular sugerían que la reducción de la expresión de *MYBBP1A* inducía la activación de *c-MYB*, y a su vez *c-MYB* participaba en el aumento de la expresión y en la activación de *PGC-1α*. En base a estas

observaciones, analizamos tanto la correlación de la expresión de *MYBBP1A* y los genes diana de c-MYB como la correlación de la expresión de *PGC-1 α* con la expresión de los genes diana de c-MYB. En el caso de *MYBBP1A* nos centramos en la correlación negativa de su expresión con la expresión de los genes diana de c-MYB, puesto que niveles bajos de expresión de *MYBBP1A* se corresponderían con niveles altos de expresión de los genes diana de c-MYB en nuestros resultados experimentales. Por el contrario, como c-MYB inducía la expresión de *PGC-1 α* , nos centramos en los genes diana de c-MYB cuya expresión correlacionaba positivamente con *PGC-1 α* . Comparamos los genes diana de c-MYB que correlacionaban negativamente con *MYBBP1A* y positivamente con *PGC-1 α* en al menos 2 de las 3 bases de datos de nuestro estudio y encontramos 54 genes en común (Figura 47A). Al analizar las rutas a las que pertenecían estos genes siguiendo la clasificación KEGG), observamos que la mayoría de estos genes pertenecían a rutas metabólicas (Figura 47B). Finalmente, representamos la expresión de *MYBBP1A*, *PGC-1 α* y estos 54 genes diana de c-MYB mediante *heatmaps*, identificando un grupo de muestras (8% del total de las muestras) con baja expresión de *MYBBP1A* y alta expresión de *PGC-1 α* y de los 54 genes diana de c-MYB (Figura 47C).

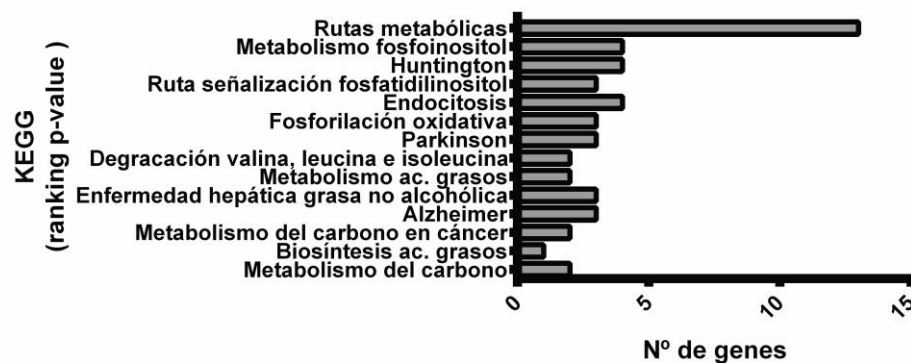
Habíamos observado que los niveles de expresión bajos de *MYBBP1A* se asociaban con altos niveles de expresión de genes regulados transcripcionalmente por c-MYB implicados en procesos metabólicos en el 8% de las muestras tumorales. En base a esta observación y a los resultados obtenidos en los ensayos celulares, que sugerían la reprogramación metabólica de glucólisis a OXPHOS al reducir los niveles de *MYBBP1A* en las líneas c-MYB⁺ y pVHL⁻, decidimos analizar la correlación entre la expresión de *MYBBP1A* y la expresión de los genes de la glucólisis y del ciclo del TCA. En primer lugar, estudiamos la correlación entre *MYBBP1A* y los genes de la glucólisis y gluconeogénesis. Observamos que la expresión de *MYBBP1A* correlacionaba positivamente con la expresión de *HK2*, enzima clave en la regulación de la glucólisis que cataliza la primera reacción de esta ruta, en todas las bases de datos analizadas (Figura 48A y 48D). Además, observamos una correlación negativa entre la expresión de *MYBBP1A* y *ADH5*, *DLAT* y *ACSS1* en las tres bases de datos, estando *DLAT* y *ACSS1* involucrados en la síntesis de acetil-CoA, intermediario clave del metabolismo oxidativo (Figura 48B y 48D). Cuando representamos la expresión de los genes de la glucólisis y gluconeogénesis y su correlación con la expresión de *MYBBP1A* en un *heatmap*, identificamos un grupo de muestras, 8% del total de las muestras aproximadamente, con bajos niveles de expresión de *HK2* y altos niveles de expresión de *PDHB*, *PFKM*, *PDHA1*, *DLD*, *DLAT*, *BPGM*, *ACSS1* (Figura 48C). Como

la expresión de *MYBBP1A* y *HK2* correlacionan positivamente, este 8% de muestras presentan bajos niveles de expresión de *MYBBP1A* también.

A Dykema-Kort, EXPO y TCGA / 2



B



C

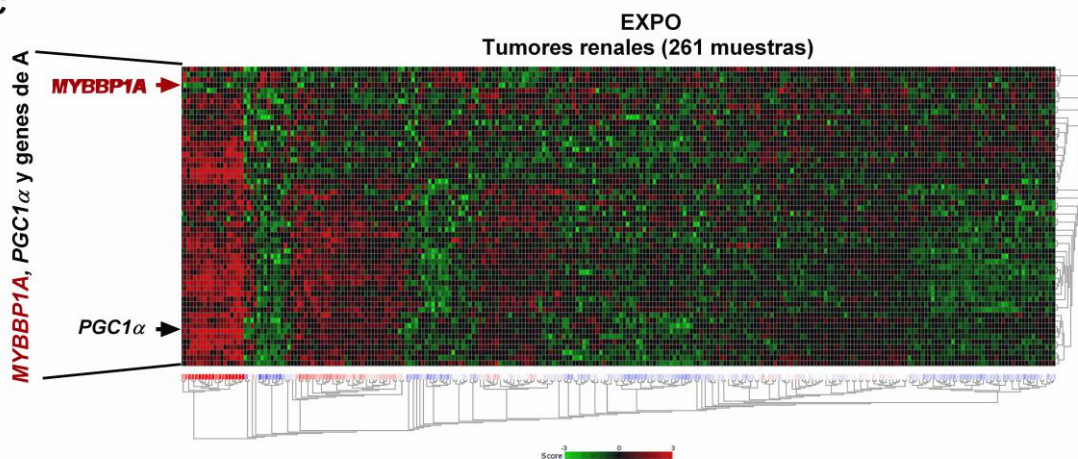


Figura 47. Los niveles de expresión bajos de *MYBBP1A* se asocian con altos niveles de expresión de genes diana de c-MYB pertenecientes a rutas metabólicas. (A) Diagrama de Venn de los genes diana de c-MYB que correlacionan negativamente con *MYBBP1A* y positivamente con *PGC1α* en al menos 2 de las 3 bases de datos analizadas **(B)** Diagrama de barras que muestra la clasificación de los genes diana de c-MYB por KEGG. En el eje y se representa el ranking de los KEGG asociados a los genes en función del p-value, siendo rutas metabólicas el KEGG con mayor significancia estadística. **(C)** Heatmap que muestra la expresión de los genes *MYBBP1A*, *PGC1α* y los 54 genes diana de c-MYB especificados en el apartado (A) en la base de datos EXPO. La barra inferior muestra los niveles de expresión de los genes, el color verde indica baja expresión y el rojo alta expresión.

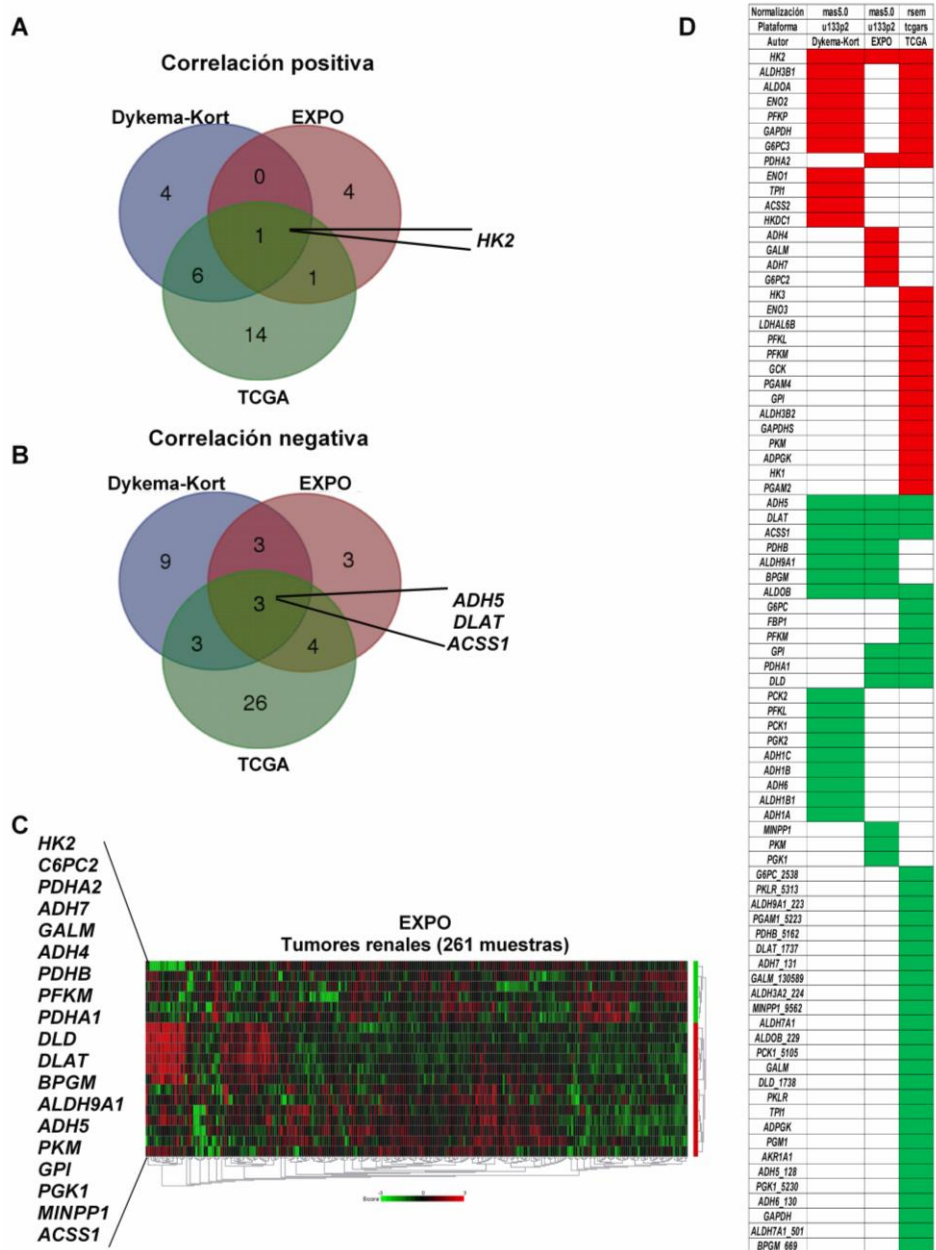


Figura 48. Estudio de la correlación de la expresión de MYBBP1A con la expresión de los genes de la glucólisis y gluconeogénesis. (A) Diagrama de Venn de los genes de la glucólisis y la gluconeogénesis que correlacionan positivamente con MYBBP1A en las tres bases de datos analizadas. (B) Diagrama de Venn de los genes de la glucólisis y la gluconeogénesis que correlacionan negativamente con MYBBP1A en las tres bases de datos analizadas (C) Heatmap que representa los niveles de expresión de los genes de la glucólisis y gluconeogénesis y su correlación con la expresión de MYBBP1A en la base de datos EXPO. La barra inferior muestra los niveles de expresión de los genes, el color verde indica baja expresión y el rojo alta expresión. La barra de la derecha muestra la correlación de la expresión de estos genes con la expresión de MYBBP1A, el color rojo indica correlación positiva y el verde correlación negativa. (D) Tabla que muestra todos los genes de la glucólisis y gluconeogénesis que correlacionan positivamente (rojo) y negativamente (verde) con MYBBP1A en las tres bases de datos analizadas.

Por último, analizamos la correlación entre la expresión de MYBBP1A y los genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Observamos que la expresión de MYBBP1A correlacionaba positivamente con la expresión de ACLY en las tres bases

de datos analizadas (Figura 49A), pero correlacionaba negativamente con 15 genes involucrados en la producción y oxidación de acetil-CoA a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Figura 49B y 49D). Además, cuando representamos la expresión de estos genes y la correlación de los mismos con la expresión de *MYBBP1A* a través de un *heatmap*, observamos que el 9% de las muestras presentaban altos niveles de expresión de varios genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos que correlacionaban negativamente con la expresión de *MYBBP1A* (Figura 49C).

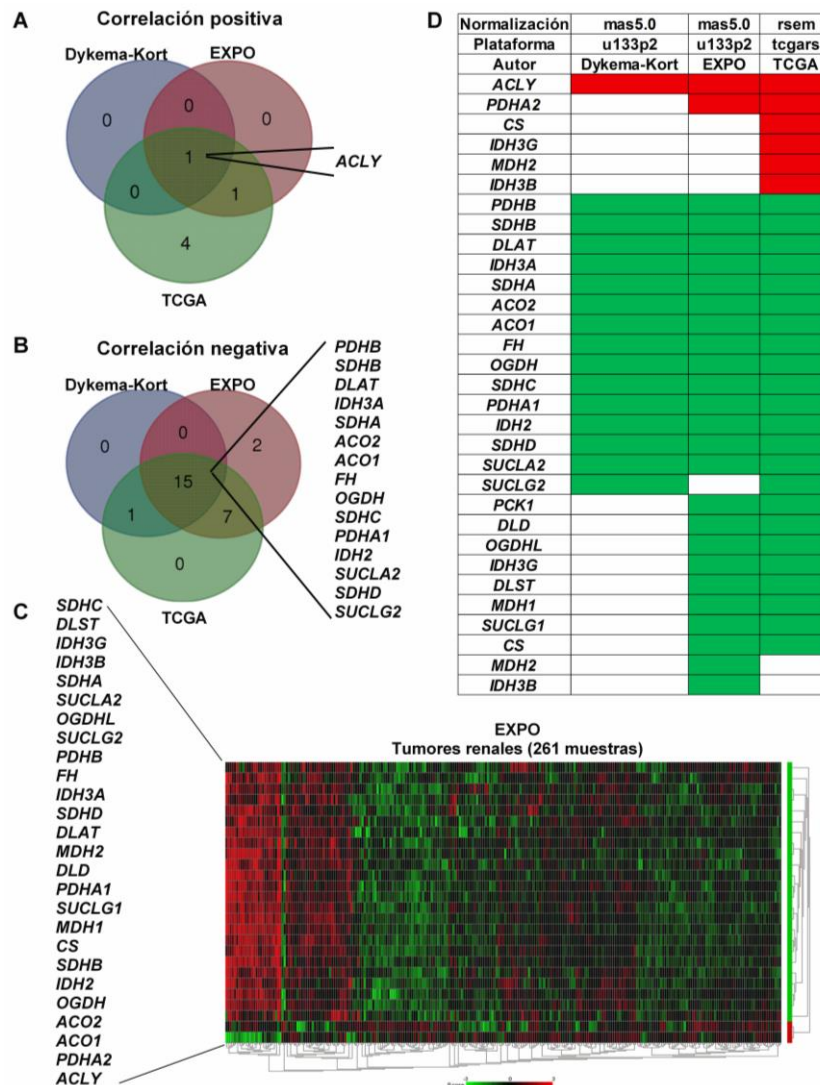


Figura 49. La expresión de *MYBBP1A* correlaciona negativamente con la expresión de genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. (A) Diagrama de Venn de los genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos que correlacionan positivamente con *MYBBP1A* en las tres bases de datos analizadas. **(B)** Diagrama de Venn de los genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos que correlacionan negativamente con *MYBBP1A* en las tres bases de datos analizadas. **(C)** *Heatmap* que representa los niveles de expresión de los genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la correlación de estos genes con la expresión de *MYBBP1A* en la base de datos EXPO. La barra inferior muestra los niveles de expresión de los genes, el color verde indica baja expresión y el rojo alta expresión. La barra de la derecha muestra la correlación de la expresión de estos genes con la expresión de *MYBBP1A*, el color rojo indica correlación positiva y el verde correlación negativa. **(D)** Tabla que muestra todos los genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos que correlaciona positivamente (rojo) y negativamente (verde) con *MYBBP1A* en las tres bases de datos analizadas.

En conjunto, los datos obtenidos del análisis de la bases de datos transcriptómicas de pacientes de cáncer de riñón sugieren que la pérdida de *MYBBP1A* se asocia con la expresión de genes reguladores del metabolismo oxidativo a través de c-MYB y PGC-1 α .

DISCUSIÓN

El microambiente tumoral es un entorno heterogéneo y dinámico determinante en el desarrollo tumor, en el que se producen continuamente cambios en la disponibilidad de nutrientes y en los niveles de oxígeno relacionados con la compleja red de vascularización del tumor. Frecuentemente se producen deficiencias locales y/o temporales en la vascularización del tumor que provocan la ausencia de glucosa, de oxígeno o de otros nutrientes esenciales para el desarrollo del tumor. En este entorno crítico, los eventos genéticos que permitan el crecimiento o la supervivencia de las células en estas condiciones les proporcionarán una ventaja selectiva sobre el resto de las células tumorales. La caracterización de los mecanismos moleculares que permiten la adaptación de las células tumorales a entornos críticos permitiría identificar nuevas dianas con potencial antitumoral. Por este motivo, nos centramos en la identificación de genes críticos en la adaptación de las células a ambientes con limitación de nutrientes. Mediante un rastreo genético de pérdida de función encontramos que la disminución de la expresión de MYBBP1A permite el crecimiento de las células en ausencia de glucosa. MYBBP1A es un supresor de tumores que inhibe la actividad de c-MYB. La disminución de MYBBP1A libera la actividad de c-MYB, conduciendo a la activación de la transcripción de los genes regulados transcripcionalmente por c-MYB y al aumento de la población de células madres tumorales. Además, la activación de c-MYB induce la expresión de PGC-1 α , regulador de procesos metabólicos cuya actividad también es inhibida por MYBBP1A. De este modo, la pérdida de MYBBP1A provoca la activación de PGC-1 α directa e indirectamente, induciendo el cambio metabólico de glucólisis a OXPHOS, el cual es más eficiente para producir energía en condiciones de limitación de glucosa³⁰. Por tanto, la combinación de estos dos efectos causados por la disminución de la expresión de MYBBP1A proporciona una ventaja selectiva a las células tumorales.

Hemos comprobado que la pérdida de expresión de MYBBP1A es relevante en tumores humanos. Mediante un análisis de los niveles de ARNm de *MYBBP1A* en muestras pareadas de tejido normal y tumoral hemos detectado la reducción de expresión de *MYBBP1A* en tumores de riñón, hígado y páncreas principalmente. Además, se han identificado numerosas mutaciones en el gen *MYBBP1A* en distintos tipos de tumores humanos, siendo la mayoría mutaciones con cambio de sentido. También se han descrito delecciones con cambio de ORF y otras mutaciones sin cambio de ORF a menor frecuencia. Nuestros resultados y los datos de expresión procedentes de la base de datos TCGA indican que la reducción de *MYBBP1A* es especialmente relevante en tumores renales. Además, la degradación de MYBBP1A está regulada por el gen supresor de tumores *VHL*⁶⁹, el cual se encuentra mutado,

delecionado o silenciado epigenéticamente en el 85% de los CCRcc esporádicos aproximadamente⁷¹. En base a estas observaciones hemos analizado una cohorte de pacientes de cáncer renal, detectando la reducción o pérdida de expresión de la proteína MYBBP1A en un 8% de los tumores. También hemos encontrado que la reducción o pérdida de la proteína MYBBP1A está asociada con la aparición de metástasis, puesto que los pacientes con tumores con baja expresión de MYBBP1A presentan estadios avanzados de la enfermedad y una mayor tasa de aparición de metástasis que los pacientes con tumores con niveles de expresión normales de MYBBP1A. Asimismo, los pacientes con tumores con baja expresión de MYBBP1A presentan una clara tendencia de peor pronóstico, tanto SLE como SG, que los pacientes con tumores con niveles normales de MYBBP1A. Este peor pronóstico ha sido confirmado con una curva Kaplan-Meier de SG en pacientes de CCRcc de la base de datos TCGA, en la que hemos observado una disminución estadísticamente significativa de la SG de pacientes con tumores con niveles bajos de MYBBP1A con respecto a pacientes con tumores con niveles normales de MYBBP1A. Esta asociación de la pérdida de MYBBP1A con la aparición de metástasis y peor prognosis apoya nuestros resultados, los cuales indican que la reducción de la expresión de MYBBP1A conduce al aumento de la población de las células madres tumorales.

Con el fin de identificar el mecanismo molecular mediante el cual *MYBBP1A* actúa como un gen supresor de tumores, hemos analizado el efecto de la sobreexpresión y del silenciamiento de *MYBBP1A* en líneas celulares de carcinoma renal. La sobreexpresión de *MYBBP1A* suprime el crecimiento celular en todas las líneas celulares utilizadas independientemente del contexto molecular. Por otro lado, la reducción de los niveles de MYBBP1A incrementa las propiedades tumorales, concretamente la proliferación, formación de colonias y crecimiento independiente de anclaje, únicamente en las líneas celulares que expresan c-MYB. También hemos observado la inducción del fenotipo equivalente a célula madre tumoral en las líneas c-MYB⁺, puesto que la reducción de los niveles de MYBBP1A en estas líneas provoca el aumento del número de holoclones, de la capacidad de formación de tumoresferas y de la expresión de genes relacionados con la regulación de la pluripotencia de las células madres tumorales y con la transición epitelio-mesénquima, como *NANOG* y *TWIST1* respectivamente. Estos resultados manifiestan la relevancia de c-MYB en el mecanismo de acción de MYBBP1A. Al contrario que c-MYB, que se localiza mayoritariamente en el nucleoplasma y se expresa fundamentalmente en la médula ósea, criptas del colon y nichos neurogénicos^{44,48}, MYBBP1A es una proteína que se localiza predominantemente en el nucléolo y se expresa en todos los tejidos^{44,62}. Se ha

descrito que MYBBP1A se localiza en el nucléolo en condiciones normales, produciéndose su translocación al nucleoplasma como consecuencia de la disminución del ARN nucleolar en condiciones de estrés, como situaciones de déficit de glucosa⁴⁵. Sin embargo, al analizar la localización de MYBBP1A en líneas de carcinoma de células renales mediante microscopía de fluorescencia, no hemos observado la translocación de MYBBP1A del nucléolo al nucleoplasma al disminuir la concentración de glucosa. Esta ausencia de translocación podría deberse a un efecto dependiente del tipo de línea celular, puesto que la translocación de MYBBP1A en respuesta a la disminución de la concentración de glucosa se había realizado en una línea celular de cáncer de mama, o por no haber conseguido las condiciones exactas de estrés por limitación de glucosa en las líneas de carcinoma renal. Sin embargo, los ensayos de inmunofluorescencia revelaron la co-localización de MYBBP1A y c-MYB en el nucléolo de las líneas de carcinoma renal tanto a glucosa alta como a glucosa baja. Este dato apoya la hipótesis de que MYBBP1A actúa como un supresor tumoral inhibiendo la actividad de c-MYB.

MYBBP1A se identificó en primer lugar por su unión al dominio NRD de c-MYB a través de motivos de cremalleras de leucina^{44,110}, sugiriéndose que podría actuar regulando la actividad transcripcional de c-MYB⁴⁴ pero no se ha descrito el efecto de esta posible regulación. En nuestro modelo celular, hemos observado que la reducción de la expresión de MYBBP1A en las líneas que expresan c-MYB se traduce en un aumento de la actividad transcripcional de c-MYB, puesto que aumentan los niveles de ARNm de *NANOG*, *CD34* y *CXCR4*, genes regulados transcripcionalmente por c-MYB^{49,111}. Tanto c-MYB como *NANOG*, *CD34* y *CXCR4* están involucrados en la adquisición y mantenimiento del fenotipo de célula madre^{48,104,112-121}. c-MYB regula los procesos de auto-renovación y diferenciación, impidiendo la diferenciación de las células^{48,112-114}. *NANOG* es un factor de transcripción esencial para el mantenimiento de la pluripotencia de las células madres embrionarias¹¹⁵⁻¹¹⁷. *CD34* es una proteína de membrana que se identificó en primer lugar en células progenitoras y células madre hematopoyéticas, pero posteriormente se ha detectado su expresión en células progenitoras de otros tejidos¹⁰⁴. Por otra parte, no se han establecido marcadores de superficie específicos de células madres tumorales en tumores renales, pero se ha descrito que *CXCR4* es esencial para el mantenimiento de las células madres tumorales renales¹¹⁸ y varios estudios proponen que sería un buen candidato como marcador específico de células madres tumorales en dichos tumores¹¹⁹⁻¹²¹. En conjunto, la activación de la transcripción de genes diana de c-MYB involucrados en el fenotipo de célula madre junto con el dato de co-localización de MYBBP1A y c-MYB,

apuntan a que MYBBP1A es un represor de c-MYB, de forma que la reducción de la expresión de MYBBP1A induce la activación de c-MYB, siendo el resultado final el aumento del fenotipo de célula madre tumoral. En consonancia estos resultados no se observaron al reducir la expresión de MYBBP1A en líneas celulares que no expresan c-MYB (ACHN y CaKi-1).

Al estudiar el efecto de la reducción de la expresión de MYBBP1A *in vivo* mediante modelos de *xenografts*, hemos observado un aumento del tamaño tumoral y la aparición de metástasis únicamente al inyectar células que expresaban c-MYB. Este resultado apoya de nuevo nuestra teoría de que la reducción de MYBBP1A aumenta la población de células madres tumorales a través de la activación de c-MYB, ya que se ha descrito que las células madres tumorales son las responsables de los procesos de recaída y metástasis^{2,122}.

Además de inducir el fenotipo de célula madre, hemos demostrado que c-MYB activa la transcripción de *PGC-1α*, puesto que la sobreexpresión de c-MYB produce el aumento de los niveles de ARNm de *PGC-1α*. Así mismo, la pérdida de MYBBP1A activa a PGC-1α de forma directa e indirecta. De forma directa, se ha publicado que MYBBP1A se une a PGC-1α regulando negativamente su actividad como co-activador transcripcional⁵⁰. Además, los resultados del ensayo de co-inmunoprecipitación de nuestro modelo celular apuntan en la misma dirección, pues observamos la unión entre MYBBP1A y PGC-1α en condiciones normales y la ausencia de dicha interacción en las líneas celulares con niveles reducidos de MYBBP1A. De este modo, la reducción o pérdida de MYBBP1A aumentaría la actividad de *PGC-1α* a través de dos mecanismos distintos, la activación de la proteína por su des-represión y el aumento de la transcripción del gen por activación de c-MYB. Por otra parte, se ha descrito que la fosforilación de PGC-1α por p38 MAPK evita la unión de MYBBP1A a PGC-1α, impidiendo su represión a PGC-1α⁵⁰. En nuestro modelo celular hemos observado el aumento de la fosforilación de p38 al reducir la expresión de MYBBP1A únicamente en las líneas que expresaban c-MYB. Además, se ha descrito que la activación de p38 está relacionada con la vía de señalización de CXCR4¹²³⁻¹²⁶, de modo que la activación de c-MYB por pérdida de MYBBP1A podría inducir también la fosforilación de p38 indirectamente al aumentar los niveles de expresión de *CXCR4*, retroalimentado positivamente la activación de PGC-1α. Esto supondría un tercer mecanismo de activación de PGC-1α tras la pérdida de MYBBP1A.

Nuestros resultados concuerdan con un estudio de homeostasis de glucosa en ratones hipomórficos para *Prep1*, en el que se relaciona el descenso de los niveles de

MYBBP1A con el aumento de la expresión de PGC-1 α y GLUT4 tanto a nivel de ARNm como de proteína⁷². Otra evidencia de la activación de PGC-1 α en nuestro modelo es la reducción de la expresión de genes de la glucólisis, puesto que se ha descrito que PGC-1 α inhibe la glucólisis en melanoma al disminuir la estabilidad de HIF1 α a nivel de proteína, conduciendo a la disminución de la expresión de genes que codifican para enzimas o proteínas relacionadas con la glucólisis y la producción de lactato¹⁰⁷. Además de inhibir la glucólisis, la activación de PGC-1 α favorece el metabolismo oxidativo^{35,36,50}. Las células c-MYB⁺ con niveles reducidos de MYBBP1A presentan mayor tasa de proliferación en medio con glucosa baja y en medio con glutamina como única fuente de carbono. Este aumento de la proliferación se produce en normoxia pero no en hipoxia, debido a que en ausencia de oxígeno desaparece la ventaja que proporciona el oxígeno a las células que basan su metabolismo en la respiración aeróbica. Además, estas células presentan mayor sensibilidad a rotenona exclusivamente en presencia de oxígeno, indicando que la respiración mitocondrial es su principal fuente de ATP. Las células c-MYB⁺ con niveles reducidos de MYBBP1A también producen mayor cantidad de ROS mitocondrial en medio con glutamina como única fuente de carbono, reflejando un incremento en la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Por tanto, el resultado final de la activación de PGC-1 α es el cambio metabólico de glucólisis a OXPHOS. Esta reprogramación metabólica es más evidente cuando las células se encuentran en medio con glutamina como única fuente de carbono, indicando que las células con niveles reducidos de MYBBP1A podrían basar su metabolismo en la glutaminólisis, favoreciendo la adaptación de las células a situaciones de escasez de glucosa. De este modo, la pérdida de MYBBP1A provoca la activación de PGC-1 α , directamente al liberarse PGC-1 α e indirectamente a través de la activación de c-MYB, la cual induce la reprogramación metabólica a OXPHOS, aumenta la glutaminólisis y la sensibilidad a inhibidores de la cadena respiratoria, sugiriendo así una alternativa terapéutica para este tipo de tumores.

Además de regular la biogénesis de la mitocondria y sus funciones, como la respiración mitocondrial, PGC-1 α regula la gluconeogénesis. Mediante su unión al factor de transcripción FOXO1, PGC-1 α activa la transcripción de genes gluconeogénicos, entre los que se encuentran *G6PC* y *PCK1*¹⁰⁸. El análisis de expresión de genes implicados en el metabolismo de la glucosa en la línea 786-O muestra que a glucosa baja las células con niveles reducidos de MYBBP1A incrementan la expresión de varios genes de la gluconeogénesis, entre los que se encuentran *G6PC*, *FBP1* y *PCK1*. La gluconeogénesis se realiza en el hígado (80%) y

en el riñón (20%), pero los aminoácidos a partir de los cuales se lleva a cabo la síntesis de glucosa difieren en cada caso, siendo la alanina el principal aminoácido gluconeogénico en el hígado y la glutamina en el riñón¹²⁷. De este modo, el aumento de la gluconeogénesis por activación de PGC-1 α podría favorecer, junto con la reprogramación metabólica a OXPHOS, la proliferación de las células renales con niveles reducidos de MYBBP1A en medio con glucosa baja pero con concentraciones normales de glutamina.

Al regular todos estos procesos metabólicos en las células tumorales, PGC-1 α participa en el mantenimiento de la homeostasis metabólica y promueve la supervivencia de las células tumorales y la metástasis en microambientes restrictivos⁴¹. Sin embargo, la relevancia del papel de PGC-1 α en procesos tumorales no reside únicamente en su función como sensor metabólico, sino en la regulación de su actividad por oncogenes y factores de transcripción involucrados en procesos tumorales y en la adquisición de la plasticidad metabólica. Por ejemplo, el factor de transcripción MITF induce la expresión de PGC-1 α aumentando la capacidad mitocondrial de un subgrupo de melanomas²⁸. Al contrario, el oncogen MYC reprime la expresión de PGC-1 α en células tumorales pancreáticas favoreciendo el metabolismo glucolítico¹²⁸. MYC ejerce un papel central en la plasticidad metabólica de las células tumorales. En función de las condiciones del microambiente tumoral promueve la glucólisis aeróbica activando la expresión de enzimas de la glucólisis e inhibiendo la expresión de PGC-1 α , o induce el metabolismo oxidativo activando la expresión de genes involucrados en la oxidación mitocondrial de la glutamina^{24,25,31,128}. En el contexto de plasticidad metabólica, c-MYB podría actuar de forma contraria a MYC activando la expresión de PGC-1 α en condiciones limitantes de glucosa, la cual conduciría al aumento de la respiración mitocondrial y de la gluconeogénesis. Sin embargo, aunque la expresión de *PGC-1 α* está regulada por c-MYB no hemos observado lo opuesto, PGC-1 α no regula la expresión de *c-MYB*. Por tanto, la inducción del fenotipo de célula madre depende de la activación de c-MYB de forma independiente a PGC-1 α .

También hemos observado que la reducción de MYBBP1A induce la activación de mTOR, quinasa que actúa como un nodo de señalización que integra las señales del microambiente. De este modo, mTOR participa en la regulación de la supervivencia, proliferación y metabolismo de las células tumorales en función de la disponibilidad de aminoácidos, de oxígeno y del estado energético de las células^{129,130}. Se ha descrito que tanto la vía de señalización PI3K como la vía Ras-MAPK activan a

mTOR, mientras que la vía de AMPK inhibe su acción¹³⁰. En nuestro modelo celular hemos observado que la activación de mTOR por pérdida de MYBBP1A se produce únicamente en líneas celulares que expresan c-MYB y carecen de pVHL.

A través de análisis proteómicos se ha identificado que MYBBP1A es una diana de ubiquitinación de pVHL⁶⁹. La unión de pVHL a MYBBP1A provoca la degradación de MYBBP1A de forma dependiente de hierro y del proteasoma⁶⁹. También se ha observado que la restauración de la expresión de pVHL en la línea 786-O conduce al aumento del contenido de ADN mitocondrial y de proteínas de la cadena respiratoria, favoreciendo así la producción de ATP mitocondrial¹³¹. En base a estos descubrimientos se ha propuesto que tumores deficientes en *VHL* presentarían niveles estabilizados de MYBBP1A, conduciendo a una mayor represión de PGC-1 α y a la reducción de la respiración mitocondrial⁶⁹. Nuestros resultados demuestran que la reducción de MYBBP1A en líneas celulares que expresan c-MYB y no expresan pVHL induce la activación de PGC-1 α , confirmando el papel central de MYBBP1A en la regulación de la respiración mitocondrial a través de PGC-1 α . Sorprendentemente, también hemos encontrado una relación de exclusividad entre c-MYB y pVHL, puesto que las líneas que expresan c-MYB no expresan pVHL y viceversa. Se ha descrito que B-MYB, otro miembro de la familia de genes *MYB*, es otra de las dianas de pVHL para la degradación vía proteasoma¹³², siendo la interacción entre B-MYB y la isoforma 3 de pVHL (19 kDa) más clara que con la isoforma 1 de pVHL (30 kDa). Además, se ha descrito que todos los miembros de la familia MYB, c-MYB incluido, interactúan con pVHL¹³². Sin embargo, en nuestros experimentos no hemos observado cambios significativos en la expresión de c-MYB ni de MYBBP1A al restaurar la expresión de pVHL en la línea 786-O. Esta ausencia de efecto podría deberse a la existencia de varias isoformas de pVHL, ya que al sobreexpresar *VHL* detectamos la isoforma 1 en vez de la isoforma 3 de pVHL, mientras que en las líneas celulares pVHL⁺ utilizadas en nuestro estudio, ACHN y CaKi-1, detectamos la isoforma 3. Otros autores también han descrito que la isoforma 3 de pVHL es la que se expresa mayoritariamente en la línea CaKi-1¹³³. El gen *VHL* da lugar a dos variantes de ARNm (V1 y V2) que codifican para tres isoformas de la proteína. V1 codifica para las isoformas 1 y 3, siendo la isoforma 3 más pequeña porque su traducción comienza en un codón interno del marco abierto de lectura del gen *VHL*, concretamente en el codón 54^{133,134}. Tanto la isoforma 1 como la 3 actúan como supresores de tumores, pero se diferencian en su localización, la isoforma 1 se encuentra fundamentalmente en el citoplasma mientras que la isoforma 3 se distribuye equitativamente entre el citoplasma y el núcleo^{133,134}. V2 codifica para la isoforma 2, cuyo peso molecular aparente es 23 kDa. Sin embargo, el papel de la

isoforma 2 en tumorigenesis no está claro aún¹³³. En nuestros ensayos hemos transfectado la línea 786-O con el cDNA correspondiente a la variante 1 del ARNm, que contiene las ORFs para las isoformas 1 y 3, pero solo hemos detectado la isoforma 1 de pVHL por western blot. Por tanto, se necesitarían más estudios para comprender la relación entre c-MYB y pVHL en profundidad.

En base a los resultados obtenidos en esta tesis y a los datos procedentes de la bibliografía, proponemos el modelo que se explica en la Figura 50. MYBBP1A es un supresor de tumores que inhibe la actividad de c-MYB y PGC-1 α uniéndose a estos dos reguladores de transcripción. c-MYB es un factor de transcripción que regula la expresión de genes involucrados en el fenotipo de célula madre, pero también regula la transcripción de genes involucrados en otros procesos biológicos como el gen *PGC-1 α* . PGC-1 α es un regulador central de procesos metabólicos que regula positivamente la respiración mitocondrial y negativamente la glucólisis. En tumores renales en los que se expresan tanto MYBBP1A como pVHL la expresión de c-MYB es muy baja o nula por su relación de exclusividad con pVHL. La degradación de MYBBP1A estaría regulada por pVHL y MYBBP1A se uniría a PGC-1 α y c-MYB reprimiendo su actividad (Figura 50A). Se ha descrito que la expresión de pVHL se pierde en el 85% de los carcinomas renales de células claras esporádicos aproximadamente⁷¹, por lo tanto esta pérdida produciría la estabilización de c-MYB en la gran mayoría de tumores renales. En este contexto, 85% de CCRcc, es cuándo la pérdida de MYBBP1A produce el aumento de la población de células madres tumorales y la reprogramación metabólica de glucólisis a OXPHOS a través del mecanismo descrito en la Figura 50B. La pérdida de la expresión de MYBBP1A provoca la activación de c-MYB, puesto que no se produce la inhibición de c-MYB por unión de MYBBP1A, aumentando así la expresión de genes regulados transcripcionalmente por c-MYB que regulan el fenotipo de célula madre, como *NANOG*, *CD34* y *CXCR4*. El aumento de la expresión de estos genes provoca el aumento de la población de células madres tumorales. Por otra parte, la pérdida de MYBBP1A también induce la activación de PGC-1 α de forma directa, al no producirse la inhibición de PGC-1 α por unión de MYBBP1A, e indirecta, al aumentar la expresión de *PGC-1 α* por acción de c-MYB. Además, c-MYB podría participar también en la activación de PGC-1 α activando la transcripción de genes involucrados en vías de señalización que conducen a la activación de p38, como *CXCR4*. Finalmente, la activación de PGC-1 α provoca el cambio metabólico a OXPHOS al inhibir la glucólisis y estimular la respiración aeróbica, facilitando la adaptación de las células tumorales a ambientes restrictivos con escasez de glucosa.

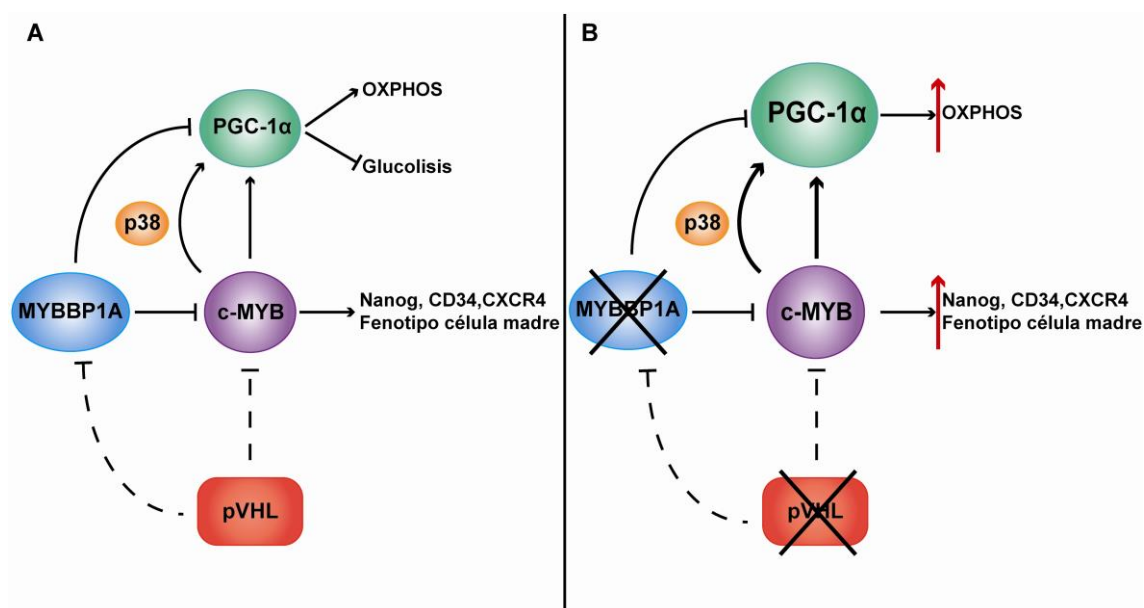


Figura 50. Modelo del papel de MYBBP1A como supresor de tumores y su posible mecanismo de acción. (A) Esquema que muestra la relación entre MYBBP1A, pVHL, c-MYB y PGC-1α y los procesos biológicos regulados por estas proteínas en condiciones normales. MYBBP1A es un represor del factor de transcripción c-MYB y del co-activador de transcripción PGC-1α, cuya expresión está regulada positivamente por c-MYB. pVHL actuaría como regulador negativo de las proteínas MYBBP1A y c-MYB. **(B) Esquema que muestra el efecto de la pérdida de expresión de MYBBP1A junto con la pérdida de expresión de pVHL.** La pérdida de MYBBP1A en células que carecen de pVHL induce la activación de c-MYB y PGC-1α, provocando el aumento del fenotipo de célula madre y el cambio metabólico a OXPHOS.

Finalmente, hemos encontrado datos de expresión de ARN en bases de datos públicas de tumores renales que apoyan el modelo propuesto. En primer lugar, hemos identificado un conjunto de genes que regulan el fenotipo de célula madre asociado a la expresión de *MYBBP1A* y *PGC-1α*. Concretamente, hemos detectado un grupo de muestras tumorales con niveles bajos de MYBBP1A y niveles altos de *PGC-1α*, *SMARCAD1*, *REST*, *PCGF5*, *SMAD2* y *SMAD4*. Los genes *SMARCAD1*, *REST* y *PCGF5* codifican para proteínas relacionadas con la remodelación de la cromatina mientras que *SMAD2* y *SMAD4* participan en la ruta de señalización de TGF-β. Asimismo, hemos identificado un grupo de tumores de la misma base de datos con el patrón de expresión contrario, niveles altos de MYBBP1A y niveles bajos de *PGC-1α*, *SMARCAD1*, *REST*, *PCGF5*, *SMAD2* y *SMAD4*.

Por otra parte, hemos identificado 54 genes diana de c-MYB cuya expresión correlaciona negativamente con *MYBBP1A* y positivamente con *PGC-1α*. También hemos observado que el 8% de los tumores renales de la base de datos EXPO presentan niveles de expresión bajos de *MYBBP1A* y niveles altos de *PGC-1α* y los 54 genes diana de c-MYB. Estos datos muestran la existencia de un porcentaje de tumores con niveles reducidos de *MYBBP1A*, alta actividad transcripcional de c-MYB y altos niveles de expresión de *PGC-1α*, tal y como proponemos en nuestro modelo.

Asimismo, estos 54 genes diana están relacionados principalmente con rutas metabólicas, confirmando el papel de MYBBP1A en la regulación del metabolismo de las células tumorales a través de c-MYB y PGC-1 α . Por último, hemos encontrado una correlación negativa entre la expresión de *MYBBP1A* y 15 genes involucrados en la producción y oxidación de acetil-CoA a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Además, hemos observado que el 9% de los tumores renales de la base de datos EXPO presentan niveles bajos de *MYBBP1A* y niveles altos de genes asociados al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, indicando que la pérdida de expresión de MYBBP1A está asociada con la inducción del metabolismo oxidativo. También cabe destacar que el porcentaje de tumores con niveles de expresión bajo de *MYBBP1A* observado en la base de datos EXPO (8-9%) es similar al porcentaje de muestras con niveles bajos de MYBBP1A que hemos encontrado en nuestra cohorte de pacientes de cáncer de riñón.

En resumen, nuestro trabajo muestra que MYBBP1A actúa como supresor tumoral reprimiendo la actividad de c-MYB y PGC-1 α . La disminución de la expresión de MYBBP1A provoca la activación de c-MYB, que conduce al aumento de la población de células madres tumorales, las cuales están asociadas con procesos metastásicos. Además, la reducción de los niveles de MYBBP1A activa a PGC-1 α de forma directa, al reducirse la unión e inhibición de MYBBP1A a PGC-1 α , e indirecta, aumentando la transcripción de *PGC-1 α* a través de c-MYB. Finalmente, la activación de PGC-1 α reprograma el metabolismo de glucólisis a OXPHOS, facilitando la adaptación de las células tumorales a microambientes con limitación de glucosa. De este modo, la pérdida de MYBBP1A proporciona una ventaja selectiva a las células tumorales que expresan c-MYB y no expresan pVHL. Por último, hemos observado que la pérdida de MYBBP1A se produce en un 8-9% de tumores renales, que podrían estudiarse como posibles dianas de terapias con inhibidores de la respiración mitocondrial.

CONCLUSIONES

1. La expresión de *MYBBP1A* se pierde en un porcentaje de tumores humanos, principalmente en tumores de riñón, hígado y páncreas.
2. La expresión de *MYBBP1A* se pierde o se reduce en el 8% de los tumores renales de nuestra cohorte de estudio. La reducción o pérdida de *MYBBP1A* está asociada a la aparición de metástasis y peor pronóstico.
3. La sobreexpresión de *MYBBP1A* suprime el crecimiento celular en líneas celulares de carcinoma de células renales independientemente del contexto molecular.
4. La reducción de la expresión de *MYBBP1A* en líneas celulares de carcinoma de células renales c-MYB⁺ y pVHL⁻ induce la activación de c-MYB, conduciendo a la activación de la transcripción de los genes diana de c-MYB y al aumento del fenotipo equivalente a célula madre tumoral.
5. La reducción de la expresión de *MYBBP1A* induce la activación de PGC-1 α de forma directa, por des-represión de la actividad de PGC-1 α , e indirecta, aumentando la transcripción de *PGC-1 α* a través de la activación de c-MYB.
6. La reducción de la expresión de *MYBBP1A* induce el cambio metabólico de glucólisis a OXPHOS a través de la activación de PGC-1 α .
7. La expresión de *MYBBP1A* correlaciona negativamente con la expresión de *SMARCA1*, *PGCF5*, *REST*, *SMAD2* y *SMAD4* en tumores renales. A su vez estos genes correlacionan positivamente con la expresión de *PGC-1 α* , identificándose un subgrupo de carcinomas renales de células claras que presentan bajos niveles de expresión de *MYBBP1A* y altos niveles de expresión de *PGC-1 α* , *SMARCA1*, *PGCF5*, *REST*, *SMAD2* y *SMAD4*.
8. La expresión de *MYBBP1A* correlaciona negativamente con la expresión de genes diana de c-MYB en tumores renales y muchos de estos genes correlacionan positivamente con la expresión de *PGC-1 α* . Estos genes diana pertenecen principalmente a rutas metabólicas.
9. La expresión de *MYBBP1A* correlaciona negativamente con la expresión de genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos en tumores renales.

10. MYBBP1A es un gen supresor de tumores que inhibe la actividad de c-MYB y PGC-1 α , siendo las células tumorales que expresan c-MYB y no expresan pVHL las que se benefician de la pérdida de MYBBP1A.

CONCLUSIONS

1. *MYBBP1A* expression is lost in some human tumors such as renal, liver and pancreas tumors.
2. The expression of *MYBBP1A* is lost or reduced in 8% of the renal tumor samples of our cohort of study. Loss or reduction of *MYBBP1A* is associated to metastasis and poor prognosis.
3. *MYBBP1A* overexpression suppresses cell growth in renal carcinoma cell lines regardless of the molecular context.
4. Downregulation of *MYBBP1A* in c-MYB⁺ and pVHL⁻ renal carcinoma cell lines induces c-MYB activation, leading to transcriptional activation of its target genes and the increment of cancer stem cell-like phenotype.
5. Downregulation of *MYBBP1A* induces PGC-1 α activation directly by des-repressing PGC-1 α activity and indirectly by increasing PGC-1 α levels through c-MYB-dependent transcription.
6. Downregulation of *MYBBP1A* induces a metabolic shift from glycolysis to OXPHOS through PGC-1 α activation.
7. The expression of *MYBBP1A* correlates negatively with the expression of *SMARCAD1*, *PGCF5*, *REST*, *SMAD2* and *SMAD4* in renal tumors. These genes also correlate positively with the expression of *PGC-1 α* . There is a subgroup of clear cell renal cell carcinomas with low expression levels of *MYBBP1A* and high expression levels of *PGC1 α* , *SMARCAD1*, *PGCF5*, *REST*, *SMAD2* and *SMAD4*.
8. The expression of *MYBBP1A* correlates negatively with the expression of c-MYB target genes in renal tumors and several of these genes correlates positively with the expression of *PGC-1 α* . These c-MYB target genes are mainly involved in metabolic pathways.
9. The expression of *MYBBP1A* correlates negatively with the expression of genes of the tricarboxylic acid cycle in renal tumors.

10. MYBBP1A is a tumor suppressor that represses c-MYB and PGC-1 α activity, being tumor cells that express c-MYB and do not express pVHL the ones that can take advantage of MYBBP1A loss.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
- 2 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 3 Cammarota, F. & Laukkanen, M. O. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Stromal Evolution and Cancer Progression. *Stem Cells Int* **2016**, 4824573, doi:10.1155/2016/4824573 (2016).
- 4 Bruno, S., Collino, F., Iavello, A. & Camussi, G. Effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on tumor growth. *Front Immunol* **5**, 382, doi:10.3389/fimmu.2014.00382 (2014).
- 5 Carnero, A. & Leonart, M. The hypoxic microenvironment: A determinant of cancer stem cell evolution. *Bioessays* **38 Suppl 1**, S65-74, doi:10.1002/bies.201670911 (2016).
- 6 Cairns, R. A., Harris, I. S. & Mak, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature reviews. Cancer* **11**, 85-95, doi:10.1038/nrc2981 (2011).
- 7 Smolkova, K. *et al.* Waves of gene regulation suppress and then restore oxidative phosphorylation in cancer cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* **43**, 950-968, doi:10.1016/j.biocel.2010.05.003 (2011).
- 8 Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309-314 (1956).
- 9 Kroemer, G. & Pouyssegur, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer cell* **13**, 472-482, doi:10.1016/j.ccr.2008.05.005 (2008).
- 10 Fischer, K. *et al.* Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* **109**, 3812-3819, doi:10.1182/blood-2006-07-035972 (2007).
- 11 Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Harris, A. L. & Sivridis, E. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer research* **66**, 632-637, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3260 (2006).
- 12 Mazurek, S., Boschek, C. B., Hugo, F. & Eigenbrodt, E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol* **15**, 300-308, doi:10.1016/j.semcancer.2005.04.009 (2005).
- 13 Bertout, J. A., Patel, S. A. & Simon, M. C. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nature reviews. Cancer* **8**, 967-975, doi:10.1038/nrc2540 (2008).
- 14 Kapitsinou, P. P. & Haase, V. H. The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice. *Cell death and differentiation* **15**, 650-659, doi:10.1038/sj.cdd.4402313 (2008).
- 15 Kaelin, W. G., Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nature reviews. Cancer* **8**, 865-873, doi:10.1038/nrc2502 (2008).
- 16 Semenza, G. L. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current opinion in genetics & development* **20**, 51-56, doi:10.1016/j.gde.2009.10.009 (2010).
- 17 Jones, R. G. *et al.* AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Molecular cell* **18**, 283-293, doi:10.1016/j.molcel.2005.03.027 (2005).
- 18 Kuhajda, F. P. AMP-activated protein kinase and human cancer: cancer metabolism revisited. *International journal of obesity* **32 Suppl 4**, S36-41, doi:10.1038/ijo.2008.121 (2008).
- 19 Shackelford, D. B. & Shaw, R. J. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nature reviews. Cancer* **9**, 563-575, doi:10.1038/nrc2676 (2009).
- 20 Bensaad, K. *et al.* TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* **126**, 107-120, doi:10.1016/j.cell.2006.05.036 (2006).
- 21 Kondoh, H. *et al.* Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer research* **65**, 177-185 (2005).
- 22 Matoba, S. *et al.* p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* **312**, 1650-1653, doi:10.1126/science.1126863 (2006).

- 23 Kim, J. W., Gao, P., Liu, Y. C., Semenza, G. L. & Dang, C. V. Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Molecular and cellular biology* **27**, 7381-7393, doi:10.1128/MCB.00440-07 (2007).
- 24 Dang, C. V., Kim, J. W., Gao, P. & Yustein, J. The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nature reviews. Cancer* **8**, 51-56, doi:10.1038/nrc2274 (2008).
- 25 Li, F. *et al.* Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Molecular and cellular biology* **25**, 6225-6234, doi:10.1128/MCB.25.14.6225-6234.2005 (2005).
- 26 Le, A. *et al.* Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell metabolism* **15**, 110-121, doi:10.1016/j.cmet.2011.12.009 (2012).
- 27 Caro, P. *et al.* Metabolic signatures uncover distinct targets in molecular subsets of diffuse large B cell lymphoma. *Cancer cell* **22**, 547-560, doi:10.1016/j.ccr.2012.08.014 (2012).
- 28 Vazquez, F. *et al.* PGC1alpha expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer cell* **23**, 287-301, doi:10.1016/j.ccr.2012.11.020 (2013).
- 29 Marin-Valencia, I. *et al.* Analysis of tumor metabolism reveals mitochondrial glucose oxidation in genetically diverse human glioblastomas in the mouse brain in vivo. *Cell metabolism* **15**, 827-837, doi:10.1016/j.cmet.2012.05.001 (2012).
- 30 Jose, C., Bellance, N. & Rossignol, R. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? *Biochim Biophys Acta* **1807**, 552-561, doi:10.1016/j.bbabi.2010.10.012 (2011).
- 31 Wise, D. R. *et al.* Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 18782-18787, doi:10.1073/pnas.0810199105 (2008).
- 32 Obre, E. & Rossignol, R. Emerging concepts in bioenergetics and cancer research: metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic remodeling, signaling and bioenergetic therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology* **59**, 167-181, doi:10.1016/j.biocel.2014.12.008 (2015).
- 33 Jin, L., Alesi, G. N. & Kang, S. Glutaminolysis as a target for cancer therapy. *Oncogene* **35**, 3619-3625, doi:10.1038/onc.2015.447 (2016).
- 34 Puigserver, P. *et al.* A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-839 (1998).
- 35 Scarpulla, R. C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 1269-1278, doi:10.1016/j.bbamcr.2010.09.019 (2011).
- 36 Ventura-Clapier, R., Garnier, A. & Veksler, V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res* **79**, 208-217, doi:10.1093/cvr/cvn098 (2008).
- 37 Nakamura, M. T., Yudell, B. E. & Loor, J. J. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* **53**, 124-144, doi:10.1016/j.plipres.2013.12.001 (2014).
- 38 Gerhart-Hines, Z. *et al.* Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *The EMBO journal* **26**, 1913-1923, doi:10.1038/sj.emboj.7601633 (2007).
- 39 Jager, S., Handschin, C., St-Pierre, J. & Spiegelman, B. M. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 12017-12022, doi:10.1073/pnas.0705070104 (2007).

- 40 Puigserver, P. *et al.* Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Molecular cell* **8**, 971-982 (2001).
- 41 Tan, Z. *et al.* The Role of PGC1alpha in Cancer Metabolism and its Therapeutic Implications. *Mol Cancer Ther* **15**, 774-782, doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0621 (2016).
- 42 Wolf, D. A. Is reliance on mitochondrial respiration a "chink in the armor" of therapy-resistant cancer? *Cancer cell* **26**, 788-795, doi:10.1016/j.ccell.2014.10.001 (2014).
- 43 Leal, J. F. *et al.* Cellular senescence bypass screen identifies new putative tumor suppressor genes. *Oncogene* **27**, 1961-1970, doi:10.1038/sj.onc.1210846 (2008).
- 44 Tavner, F. J. *et al.* Molecular cloning reveals that the p160 Myb-binding protein is a novel, predominantly nucleolar protein which may play a role in transactivation by Myb. *Molecular and cellular biology* **18**, 989-1002 (1998).
- 45 Kumazawa, T. *et al.* Novel nucleolar pathway connecting intracellular energy status with p53 activation. *The Journal of biological chemistry* **286**, 20861-20869, doi:10.1074/jbc.M110.209916 (2011).
- 46 Yamauchi, T., Keough, R. A., Gonda, T. J. & Ishii, S. Ribosomal stress induces processing of Mybbp1a and its translocation from the nucleolus to the nucleoplasm. *Genes Cells* **13**, 27-39, doi:10.1111/j.1365-2443.2007.01148.x (2008).
- 47 Shimizu, K. *et al.* The fifth essential DNA polymerase phi in *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the nucleolus and plays an important role in synthesis of rRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 9133-9138, doi:10.1073/pnas.142277999 (2002).
- 48 Ramsay, R. G. & Gonda, T. J. MYB function in normal and cancer cells. *Nature reviews. Cancer* **8**, 523-534, doi:10.1038/nrc2439 (2008).
- 49 Zhou, Y. & Ness, S. A. Myb proteins: angels and demons in normal and transformed cells. *Front Biosci (Landmark Ed)* **16**, 1109-1131 (2011).
- 50 Fan, M. *et al.* Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1alpha: modulation by p38 MAPK. *Genes & development* **18**, 278-289, doi:10.1101/gad.1152204 (2004).
- 51 Diaz, V. M. *et al.* p160 Myb-binding protein interacts with Prep1 and inhibits its transcriptional activity. *Molecular and cellular biology* **27**, 7981-7990, doi:10.1128/MCB.01290-07 (2007).
- 52 Owen, H. R. *et al.* MYBBP1a is a novel repressor of NF-kappaB. *J Mol Biol* **366**, 725-736, doi:10.1016/j.jmb.2006.11.099 (2007).
- 53 Hara, Y. *et al.* Molecular characterization of Mybbp1a as a co-repressor on the Period2 promoter. *Nucleic Acids Res* **37**, 1115-1126, doi:10.1093/nar/gkn1013 (2009).
- 54 Jones, L. C., Okino, S. T., Gonda, T. J. & Whitlock, J. P., Jr. Myb-binding protein 1a augments AhR-dependent gene expression. *The Journal of biological chemistry* **277**, 22515-22519, doi:10.1074/jbc.M200740200 (2002).
- 55 Kuroda, T. *et al.* RNA content in the nucleolus alters p53 acetylation via MYBBP1A. *The EMBO journal* **30**, 1054-1066, doi:10.1038/emboj.2011.23 (2011).
- 56 Holmberg Olausson, K., Nister, M. & Lindstrom, M. S. p53 -Dependent and -Independent Nucleolar Stress Responses. *Cells* **1**, 774-798, doi:10.3390/cells1040774 (2012).
- 57 Ono, W. *et al.* Nucleolar protein, Myb-binding protein 1A, specifically binds to nonacetylated p53 and efficiently promotes transcriptional activation. *Biochem Biophys Res Commun* **434**, 659-663, doi:10.1016/j.bbrc.2013.04.006 (2013).
- 58 Ono, W. *et al.* The nucleolar protein Myb-binding protein 1A (MYBBP1A) enhances p53 tetramerization and acetylation in response to nucleolar disruption. *The Journal of biological chemistry* **289**, 4928-4940, doi:10.1074/jbc.M113.474049 (2014).

- 59 Kumazawa, T. *et al.* Gradual reduction in rRNA transcription triggers p53 acetylation and apoptosis via MYBBP1A. *Scientific reports* **5**, 10854, doi:10.1038/srep10854 (2015).
- 60 Ho, L. *et al.* An embryonic stem cell chromatin remodeling complex, esBAF, is essential for embryonic stem cell self-renewal and pluripotency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 5181-5186, doi:10.1073/pnas.0812889106 (2009).
- 61 Yang, C. C. *et al.* Epigenetic silencing of myogenic gene program by Myb-binding protein 1a suppresses myogenesis. *The EMBO journal* **31**, 1739-1751, doi:10.1038/emboj.2012.24 (2012).
- 62 Mori, S. *et al.* Myb-binding protein 1A (MYBBP1A) is essential for early embryonic development, controls cell cycle and mitosis, and acts as a tumor suppressor. *PloS one* **7**, e39723, doi:10.1371/journal.pone.0039723 (2012).
- 63 Perrera, C. *et al.* Identification of Myb-binding protein 1A (MYBBP1A) as a novel substrate for aurora B kinase. *The Journal of biological chemistry* **285**, 11775-11785, doi:10.1074/jbc.M109.068312 (2010).
- 64 Tsuchiya, M. *et al.* Critical role of the nucleolus in activation of the p53-dependent postmitotic checkpoint. *Biochem Biophys Res Commun* **407**, 378-382, doi:10.1016/j.bbrc.2011.03.029 (2011).
- 65 George, B. *et al.* Regulation and function of Myb-binding protein 1A (MYBBP1A) in cellular senescence and pathogenesis of head and neck cancer. *Cancer Lett* **358**, 191-199, doi:10.1016/j.canlet.2014.12.042 (2015).
- 66 Hardie, D. G. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci* **117**, 5479-5487, doi:10.1242/jcs.01540 (2004).
- 67 Hochstatter, J. *et al.* Myb-binding protein 1a (Mybbp1a) regulates levels and processing of pre-ribosomal RNA. *The Journal of biological chemistry* **287**, 24365-24377, doi:10.1074/jbc.M111.303719 (2012).
- 68 Tan, B. C. *et al.* Epigenetic silencing of ribosomal RNA genes by Mybbp1a. *J Biomed Sci* **19**, 57, doi:10.1186/1423-0127-19-57 (2012).
- 69 Lai, Y., Qiao, M., Song, M., Weintraub, S. T. & Shiao, Y. Quantitative proteomics identifies the Myb-binding protein p160 as a novel target of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *PloS one* **6**, e16975, doi:10.1371/journal.pone.0016975 (2011).
- 70 Nielsen, S. M. *et al.* Von Hippel-Lindau Disease: Genetics and Role of Genetic Counseling in a Multiple Neoplasia Syndrome. *J Clin Oncol* **34**, 2172-2181, doi:10.1200/JCO.2015.65.6140 (2016).
- 71 Shenoy, N. & Pagliaro, L. Sequential pathogenesis of metastatic VHL mutant clear cell renal cell carcinoma: putting it together with a translational perspective. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **27**, 1685-1695, doi:10.1093/annonc/mdw241 (2016).
- 72 Oriente, F. *et al.* Prep1 deficiency induces protection from diabetes and increased insulin sensitivity through a p160-mediated mechanism. *Molecular and cellular biology* **28**, 5634-5645, doi:10.1128/MCB.00117-08 (2008).
- 73 Kanzleiter, T. *et al.* Pknox1/Prep1 regulates mitochondrial oxidative phosphorylation components in skeletal muscle. *Molecular and cellular biology* **34**, 290-298, doi:10.1128/MCB.01232-13 (2014).
- 74 Keough, R. *et al.* Molecular cloning and chromosomal mapping of the human homologue of MYB binding protein (P160) 1A (MYBBP1A) to 17p13.3. *Genomics* **62**, 483-489, doi:10.1006/geno.1999.6035 (1999).
- 75 Acuna Sanhueza, G. A. *et al.* Opposing function of MYBBP1A in proliferation and migration of head and neck squamous cell carcinoma cells. *BMC cancer* **12**, 72, doi:10.1186/1471-2407-12-72 (2012).

- 76 Akaogi, K., Ono, W., Hayashi, Y., Kishimoto, H. & Yanagisawa, J. MYBBP1A suppresses breast cancer tumorigenesis by enhancing the p53 dependent anoikis. *BMC cancer* **13**, 65, doi:10.1186/1471-2407-13-65 (2013).
- 77 Karim, M. F. *et al.* Inhibition of H3K18 deacetylation of Sirt7 by Myb-binding protein 1a (Mybbp1a). *Biochem Biophys Res Commun* **441**, 157-163, doi:10.1016/j.bbrc.2013.10.020 (2013).
- 78 Nahalkova, J. The protein-interaction network with functional roles in tumorigenesis, neurodegeneration, and aging. *Mol Cell Biochem* **423**, 187-196, doi:10.1007/s11010-016-2836-5 (2016).
- 79 Nahalkova, J. & Tomkinson, B. TPPII, MYBBP1A and CDK2 form a protein-protein interaction network. *Arch Biochem Biophys* **564**, 128-135, doi:10.1016/j.abb.2014.09.017 (2014).
- 80 Graham, F. L. & van der Eb, A. J. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* **54**, 536-539 (1973).
- 81 Locke, M., Heywood, M., Fawell, S. & Mackenzie, I. C. Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer research* **65**, 8944-8950, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0931 (2005).
- 82 Ferrer, I. *et al.* Loss of the tumor suppressor spinophilin (PPP1R9B) increases the cancer stem cell population in breast tumors. *Oncogene* **35**, 2777-2788, doi:10.1038/onc.2015.341 (2016).
- 83 Hirschmann-Jax, C. *et al.* A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 14228-14233, doi:10.1073/pnas.0400067101 (2004).
- 84 Setoguchi, T., Taga, T. & Kondo, T. Cancer stem cells persist in many cancer cell lines. *Cell cycle* **3**, 414-415, doi:10.4161/cc.3.4.799 (2004).
- 85 Barrandon, Y. & Green, H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 2302-2306 (1987).
- 86 Beaver, C. M., Ahmed, A. & Masters, J. R. Clonogenicity: holoclones and meroclones contain stem cells. *PLoS one* **9**, e89834, doi:10.1371/journal.pone.0089834 (2014).
- 87 Cerami, E. *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery* **2**, 401-404, doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0095 (2012).
- 88 Gao, J. *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling* **6**, pl1, doi:10.1126/scisignal.2004088 (2013).
- 89 Diez-Villanueva, A., Mallona, I. & Peinado, M. A. Wanderer, an interactive viewer to explore DNA methylation and gene expression data in human cancer. *Epigenetics & chromatin* **8**, 22, doi:10.1186/s13072-015-0014-8 (2015).
- 90 Chen, E. Y. *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC bioinformatics* **14**, 128, doi:10.1186/1471-2105-14-128 (2013).
- 91 Kuleshov, M. V. *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res* **44**, W90-97, doi:10.1093/nar/gkw377 (2016).
- 92 Abaan, O. D. *et al.* The exomes of the NCI-60 panel: a genomic resource for cancer biology and systems pharmacology. *Cancer research* **73**, 4372-4382, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3342 (2013).
- 93 Dontu, G., Al-Hajj, M., Abdallah, W. M., Clarke, M. F. & Wicha, M. S. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell proliferation* **36 Suppl 1**, 59-72 (2003).
- 94 Garcia-Heredia, J. M., Verdugo Sivianes, E. M., Lucena-Cacace, A., Molina-Pinelo, S. & Carnero, A. Numb-like (NumbL) downregulation increases tumorigenicity, cancer stem

- cell-like properties and resistance to chemotherapy. *Oncotarget* **7**, 63611-63628, doi:10.18632/oncotarget.11553 (2016).
- 95 Dontu, G. *et al.* In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes & development* **17**, 1253-1270, doi:10.1101/gad.1061803 (2003).
 - 96 Ponti, D. *et al.* Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer research* **65**, 5506-5511, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0626 (2005).
 - 97 Moon, J. H. *et al.* Reprogramming fibroblasts into induced pluripotent stem cells with Bmi1. *Cell research* **21**, 1305-1315, doi:10.1038/cr.2011.107 (2011).
 - 98 Chen, L. & Daley, G. Q. Molecular basis of pluripotency. *Human molecular genetics* **17**, R23-27, doi:10.1093/hmg/ddn050 (2008).
 - 99 Zhang, P., Andrianakos, R., Yang, Y., Liu, C. & Lu, W. Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression. *The Journal of biological chemistry* **285**, 9180-9189, doi:10.1074/jbc.M109.077958 (2010).
 - 100 Boumahdi, S. *et al.* SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature* **511**, 246-250, doi:10.1038/nature13305 (2014).
 - 101 Siegle, J. M. *et al.* SOX2 is a cancer-specific regulator of tumour initiating potential in cutaneous squamous cell carcinoma. *Nature communications* **5**, 4511, doi:10.1038/ncomms5511 (2014).
 - 102 Fagnocchi, L. *et al.* A Myc-driven self-reinforcing regulatory network maintains mouse embryonic stem cell identity. *Nature communications* **7**, 11903, doi:10.1038/ncomms11903 (2016).
 - 103 Singh, A. & Settleman, J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* **29**, 4741-4751, doi:10.1038/onc.2010.215 (2010).
 - 104 Sidney, L. E., Branch, M. J., Dunphy, S. E., Dua, H. S. & Hopkinson, A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem cells* **32**, 1380-1389, doi:10.1002/stem.1661 (2014).
 - 105 Michael, L. F. *et al.* Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 3820-3825, doi:10.1073/pnas.061035098 (2001).
 - 106 Cowell, R. M., Talati, P., Blake, K. R., Meador-Woodruff, J. H. & Russell, J. W. Identification of novel targets for PGC-1 α and histone deacetylase inhibitors in neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **379**, 578-582, doi:10.1016/j.bbrc.2008.12.109 (2009).
 - 107 Lim, J. H., Luo, C., Vazquez, F. & Puigserver, P. Targeting mitochondrial oxidative metabolism in melanoma causes metabolic compensation through glucose and glutamine utilization. *Cancer research* **74**, 3535-3545, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2893-T (2014).
 - 108 Puigserver, P. *et al.* Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature* **423**, 550-555, doi:10.1038/nature01667 (2003).
 - 109 Lorendeau, D. *et al.* Dual loss of succinate dehydrogenase (SDH) and complex I activity is necessary to recapitulate the metabolic phenotype of SDH mutant tumors. *Metabolic engineering*, doi:10.1016/j.ymben.2016.11.005 (2016).
 - 110 Favier, D. & Gonda, T. J. Detection of proteins that bind to the leucine zipper motif of c-Myb. *Oncogene* **9**, 305-311 (1994).

- 111 Quintana, A. M., Liu, F., O'Rourke, J. P. & Ness, S. A. Identification and regulation of c-Myb target genes in MCF-7 cells. *BMC cancer* **11**, 30, doi:10.1186/1471-2407-11-30 (2011).
- 112 Cheasley, D. *et al.* Myb controls intestinal stem cell genes and self-renewal. *Stem cells* **29**, 2042-2050, doi:10.1002/stem.761 (2011).
- 113 Lieu, Y. K. & Reddy, E. P. Conditional c-myb knockout in adult hematopoietic stem cells leads to loss of self-renewal due to impaired proliferation and accelerated differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 21689-21694, doi:10.1073/pnas.0907623106 (2009).
- 114 Zuber, J. *et al.* An integrated approach to dissecting oncogene addiction implicates a Myb-coordinated self-renewal program as essential for leukemia maintenance. *Genes & development* **25**, 1628-1640, doi:10.1101/gad.17269211 (2011).
- 115 Chambers, I. *et al.* Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, 643-655 (2003).
- 116 Chang, D. F. *et al.* Molecular characterization of the human NANOG protein. *Stem cells* **27**, 812-821, doi:10.1634/stemcells.2008-0657 (2009).
- 117 Zhang, W., Sui, Y., Ni, J. & Yang, T. Insights into the Nanog gene: A propeller for stemness in primitive stem cells. *International journal of biological sciences* **12**, 1372-1381, doi:10.7150/ijbs.16349 (2016).
- 118 Gassenmaier, M. *et al.* CXCR4 chemokine receptor 4 is essential for maintenance of renal cell carcinoma-initiating cells and predicts metastasis. *Stem cells* **31**, 1467-1476, doi:10.1002/stem.1407 (2013).
- 119 Cheng, B. *et al.* Cancer stem cell markers predict a poor prognosis in renal cell carcinoma: a meta-analysis. *Oncotarget* **7**, 65862-65875, doi:10.18632/oncotarget.11672 (2016).
- 120 Peired, A. J., Sisti, A. & Romagnani, P. Renal Cancer Stem Cells: Characterization and Targeted Therapies. *Stem Cells Int* **2016**, 8342625, doi:10.1155/2016/8342625 (2016).
- 121 Yuan, Z. X. *et al.* Targeting Strategies for Renal Cell Carcinoma: From Renal Cancer Cells to Renal Cancer Stem Cells. *Frontiers in pharmacology* **7**, 423, doi:10.3389/fphar.2016.00423 (2016).
- 122 Carnero, A. *et al.* The cancer stem-cell signaling network and resistance to therapy. *Cancer treatment reviews* **49**, 25-36, doi:10.1016/j.ctrv.2016.07.001 (2016).
- 123 Broussas, M. *et al.* A New Anti-CXCR4 Antibody That Blocks the CXCR4/SDF-1 Axis and Mobilizes Effector Cells. *Mol Cancer Ther* **15**, 1890-1899, doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0041 (2016).
- 124 Sun, Y., Cheng, Z., Ma, L. & Pei, G. Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *The Journal of biological chemistry* **277**, 49212-49219, doi:10.1074/jbc.M207294200 (2002).
- 125 Zhan, T. *et al.* MIM regulates the trafficking of bone marrow cells via modulating surface expression of CXCR4. *Leukemia* **30**, 1327-1334, doi:10.1038/leu.2016.39 (2016).
- 126 Zuo, K. *et al.* SCF/c-kit transactivates CXCR4-serine 339 phosphorylation through G protein-coupled receptor kinase 6 and regulates cardiac stem cell migration. *Scientific reports* **6**, 26812, doi:10.1038/srep26812 (2016).
- 127 DeFronzo, R. A., Norton, L. & Abdul-Ghani, M. Renal, metabolic and cardiovascular considerations of SGLT2 inhibition. *Nature reviews. Nephrology* **13**, 11-26, doi:10.1038/nrneph.2016.170 (2017).
- 128 Sancho, P. *et al.* MYC/PGC-1 α Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cell metabolism* **22**, 590-605, doi:10.1016/j.cmet.2015.08.015 (2015).

- 129 Sonenberg, N. & Hinnebusch, A. G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* **136**, 731-745, doi:10.1016/j.cell.2009.01.042 (2009).
- 130 Kim, L. C., Cook, R. S. & Chen, J. mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene*, doi:10.1038/onc.2016.363 (2016).
- 131 Hervouet, E. *et al.* A new role for the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: stimulation of mitochondrial oxidative phosphorylation complex biogenesis. *Carcinogenesis* **26**, 531-539, doi:10.1093/carcin/bgi001 (2005).
- 132 Okumura, F. *et al.* Parallel Regulation of von Hippel-Lindau Disease by pVHL-Mediated Degradation of B-Myb and Hypoxia-Inducible Factor alpha. *Molecular and cellular biology* **36**, 1803-1817, doi:10.1128/MCB.00067-16 (2016).
- 133 Chesnel, F. *et al.* The von Hippel-Lindau tumour suppressor gene: uncovering the expression of the pVHL172 isoform. *British journal of cancer* **113**, 336-344, doi:10.1038/bjc.2015.189 (2015).
- 134 Iliopoulos, O., Ohh, M. & Kaelin, W. G., Jr. pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 11661-11666 (1998).

ANEXO: PUBLICACIONES

1. **Blanca Felipe-Abrio**, Carmen Sáez, Amancio Carnero. *Loss of MYBBP1A induces stem-cell phenotype and metabolic switch to OXPHOS through c-MYB activation in renal cancer*. Enviado.
2. Otero-Albiol Daniel, **Felipe-Abrio Blanca**. *MicroRNA Regulating Metabolic Reprogramming in Tumor Cells: New Tumor Markers*. Cancer Translational Medicine. 2016; 2(6): 175-81. DOI: 10.4103/2395-3977.196909. (Review)
3. José M. García-Heredia, **Blanca Felipe-Abrio**, David Cano*, Amancio Carnero*. *Genetic modification of hypoxia signalling in animal models and its effect on cancer*. Clinical and Translational Oncology. 2015; 17(2):90-102. DOI: 10.1007/s12094-014-1236-0. (Review)

Contribuciones a congresos:

1. ISCaM 2016. Brussels (Belgium). 26-29/10/2016.
Póster: Ždravlević M, **B. Felipe-Abrio**, Pouysségur J. *The role of lactate dehydrogenase (LDH) isoforms in metabolic reprogramming of cancer cells*.
2. 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research. Manchester (UK). 9-12/07/2016.
Poster: **B. Felipe-Abrio**, M.P. Jiménez García, E.M. Verdugo Sivianes, A. Lucena Cacace, D. Otero Albiol, M. Perez , J. Peinado Serrano , S. Munoz Galván , J.M. García Heredia , A. Carnero Moya. *Absence of MYBBP1A translocation from nucleolus to nucleoplasm under glucose starvation in renal carcinoma cell lines*.